



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

“Identificación de genes: betalactamasas de espectro extendido (Tem y Shv) y carbapenemasas (Ndm Y Kpc), en cepas de *klebsiella pneumoniae* en un hospital de nivel IV de Lima Metropolitana, Perú”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

María Victoria CAPARACHIN GONZÁLES

Jhosselin María MALLQUI ZAMALLOA

ASESOR

Dra. Mirtha ROQUE ALCARRAZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Caparachin V, Mallqui J. Identificación de genes: betalactamasas de espectro extendido (TEM y SHV) y carbapenemasas (NDM Y KPC), en cepas de *klebsiella pneumoniae* en un hospital de nivel IV de Lima Metropolitana, Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	--
DNI o pasaporte del autor	71655871 / 76271280
Código ORCID del asesor	0000-0001-9154-5797
DNI o pasaporte del asesor	08644654
Grupo de investigación	Resistencia bacteriana
Agencia financiadora	País de la agencia financiadora
	Nombre y siglas de la agencia financiadora
	Nombre del programa financiero
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Número de contrato
	Lugar
	Lima, Perú
	Coordenadas geográficas
Año o rango de años en que se realizó la investigación	--
	2018 - 2019
Disciplinas OCDE	--



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"IDENTIFICACIÓN DE GENES: BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (TEM Y SHV) Y CARBAPENEMASAS (NDM Y KPC), EN CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EN UN HOSPITAL DE NIVEL IV DE LIMA METROPOLITANA, PERU"

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

MARÍA VICTORIA CAPARACHIN GONZÁLES Y
JHOSSSELIN MARÍA MALLQUI ZAMALLOA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

-----Diecinueve (19) CON MENCIÓN-----

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 06 de agosto de 2020

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidenta

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios, por su grande amor con el cual me amó y se dio a sí mismo por mí; por la vida y familia que me dio.

Doy gracias a mis padres, Dora y Rolando, por su amor infinito y por mostrármelo en sus acciones, por su apoyo para hacerme cada día mejor, es elogiado.

A mi hermana Lucía, un ejemplo a seguir, te admiro mucho, muchas gracias por tu incondicional apoyo y por ser quién eres.

A mi hermano Daniel, por darme muchas alegrías, por ser mi mejor amigo y hermano a la vez, muchas gracias hermanito.

A toda mi familia Caparachin y Gonzáles, porque me mostraron lo mejor de ustedes, por darme su aliento y su cariño.

A mi familia en Cristo, por compartir conmigo muchos momentos importantes y aprender juntos del amor de Dios.

Muchas gracias a todos ustedes.

María Victoria Caparachin Gonzáles

DEDICATORIA

Gracias Dios por tu amor, por mi bella familia y todas tus bendiciones.

A mis padres, María y Jorge quiero decirles gracias: por darme la vida, por estar siempre conmigo, apoyándome y enseñándome a ser cada día mejor, por siempre creer en mí y por cada sueño hecho realidad, esto es para ustedes, con todo mi amor.

A mi hermana Viviana por su cariño, apoyo, comprensión, alegría y confianza, gracias por siempre preocuparte por todas las cosas que hago. Te quiero mucho.

A mi hermano Junior por su cariño y apoyarme a cumplir mis sueños.

A mi sobrina Itzel por darme mucha alegría, por siempre sacarme una sonrisa y por siempre preocuparse por mí.

A mis maestros de primaria, secundaria y superior estoy muy agradecida por sus enseñanzas y motivarme a luchar por mis sueños y hacerlos realidad.

A mis abuelitos Sirena y Pedro por haberme brindado todo su apoyo incondicional y por cuidarme desde el cielo.

Jhosselin María Mallqui Zamalloa

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirnos estar aquí y brindarnos las fuerzas necesarias para derribar todas las barreras que se nos ha presentado.

A los docentes de nuestra facultad, gracias por darnos una excelente educación y motivarnos a ser siempre mejores cada día.

A nuestros amigos y amigas por compartir tantos momentos de aprendizaje, proyectos, sueños y risas, sigamos adelante.

A nuestra asesora, Mirtha Roque Alcarraz por los conocimientos que compartió con nosotros, por sus consejos y valioso tiempo.

Al Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, por permitirnos y darnos las herramientas necesarias para desarrollar la presente tesis.

A los distinguidos miembros del jurado: Dra. María Elena Salazar Salvatierra, Dr. Víctor Crispín Pérez, Dra. Gladys Martha Delgado Pérez, Dra. María Elena Montoya Alfaro por sus sugerencias para la culminación del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	15
II.	HIPÓTESIS Y VARIABLES	17
	2.1 Hipótesis	17
	2.2 Variables	17
	2.2.1 Variable dependiente.....	17
	2.2.2 Variable independiente	17
III.	OBJETIVO.....	17
	3.1 Objetivo general:	17
	3.2 Objetivos específicos:	17
IV.	MARCO TEÓRICO.....	18
	4.1 Antecedentes	18
	4.1.1 Antecedentes Internacionales	18
	4.1.2 Antecedentes Nacionales	24
	4.2 Base teórica	28
	4.2.1 Enterobacterias	28
	4.2.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
	4.2.1.1.1 Taxonomía	28
	4.2.1.1.2 Características microbiológicas	29
	4.2.1.1.3 Hábitat / patogenia.....	30
	4.2.1.1.4 Factores de Virulencia	31
	4.2.1.1.5 Importancia Clínica	34
	4.2.2 Clasificación de antibióticos betalactámicos.....	35
	4.2.3 Mecanismos de resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
	4.2.3.1 Modificación del sitio objetivo (Target)	38
	4.2.3.2 Modificación del antibiótico por acción de enzimas	39
	4.2.3.3 Impermeabilidad bacteriana	44

4.2.3.4	Expulsión del antibiótico	45
4.2.3.5	Formación de biofilms	46
4.2.4	Elementos genéticos móviles de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
4.2.4.1	Integrones	46
4.2.4.2	Transposones.....	47
4.2.4.3	Plásmidos	47
V.	METODOLOGÍA.....	48
5.1	Tipo y diseño general de estudio	48
5.2	Materiales	48
5.2.1	Material Biológico	48
5.2.2	Cepas control	48
5.2.3	Materiales y equipos de laboratorio	48
5.3	Procedimiento	49
5.3.1	Recolección y conservación de cepas clínicas.....	49
5.3.2	Susceptibilidad antimicrobiana	49
5.3.3	Activación de las cepas	49
5.3.4	Identificación bioquímica	49
5.3.5	Control de Calidad	49
5.3.6	Confirmación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido	50
5.3.7.	Confirmación fenotípica de carbapenemasas.....	51
5.3.8	Extracción de ADN	53
5.3.9	Amplificación	54
3.2.10	Electroforesis en gel Agarosa.....	59
VI.	RESULTADOS	60
6.1	Susceptibilidad Antimicrobiana y características epidemiológicas.....	60
6.2	Identificación bioquímica.....	60
6.3	Confirmación fenotípica	66

6.3.1	Confirmación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido	66
6.3.2.	Confirmación fenotípica de carbapenemasas.....	66
6.4	Confirmación genotípica.....	71
6.4.1	Confirmación genotípica de bla _{TEM} y bla _{SHV}	71
6.4.2	Confirmación genotípica de bla _{KPC} y bla _{NDM}	73
VII.	DISCUSIÓN	75
VIII.	CONCLUSIONES.....	80
IX.	RECOMENDACIONES	81
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	82
XI.	ANEXOS	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
Tabla 2. Propiedades Bioquímicas en <i>K. pneumoniae</i>	30
Tabla 3. Clasificación de Cefalosporinas	36
Tabla 4. Clasificación de betalactamasas en bacterias gram negativas, adaptación en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
Tabla 5. Secuencia de cebadores de los genes bla _{TEM} y bla _{SHV} y peso del amplicón.....	54
Tabla 6. Formulación para amplificación en PCR del gen bla _{SHV}	54
Tabla 7. Formulación para amplificación en PCR del gen bla _{TEM}	55
Tabla 8. Parámetros para la amplificación de los genes bla _{TEM} y bla _{SHV}	56
Tabla 9. Secuencia de cebadores de los genes bla _{KPC} y bla _{NDM} y peso del amplicón.....	57
Tabla 10. Formulación para amplificación en PCR del gen bla _{KPC}	57
Tabla 11. Formulación para amplificación en PCR del gen bla _{NDM}	58
Tabla 12. Parámetros para la amplificación de los genes bla _{KPC} y bla _{NDM}	59
Tabla 13. Materiales y equipos de laboratorio	99
Tabla 14. Resultados de la Identificación bioquímica de las cepas en estudio. ...	100
Tabla 15. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de pacientes clínicos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen	102
Tabla 16. Características clínico-epidemiológicas de las cepas clínicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> procedentes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.	105
Tabla 17. Fenotipo y genotipo de las cepas estudiadas según procedencia	107
Tabla 18. Matriz de Operacionalización de variables.....	109
Tabla 19. Matriz de Consistencia	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en Agar Mac Conkey	29
Figura 2. Representación de factores involucrados en la virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
Figura 3. Estructura y disposición del LPS en bacterias Gram negativas.	33
Figura 4. Resultados del perfil de susceptibilidad de las cepas clínicas en estudio de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
Figura 5. Distribución de cepas clínicas en estudio de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por procedencia de servicio	62
Figura 6. Distribución de las cepas clínicas en estudio de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por procedencia de tipo de muestra.....	63
Figura 7. Identificación de cepas clínicas en Agar Mac Conkey	64
Figura 8. Identificación bioquímica en medios TSI, citrato, LIA, MIO	65
Figura 9. Confirmación fenotípica de BLEE	67
Figura 10. Método modificado de inactivación de carbapenemasas (MICm)	68
Figura 11. Sinergia a doble disco con ácido fenilborónico (APB).....	69
Figura 12. Sinergia a doble disco con el inhibidor etilendiaminotetraacético asociado a mercaptoacetato de sodio (MBL)	70
Figura 13. Electroforesis de PCR convencional para el gen bla _{TEM} de 1078bp	71
Figura 14. Electroforesis de PCR convencional para el gen bla _{SHV} de 870 bp.....	72
Figura 15. Electroforesis de PCR convencional para el gen bla _{KPC} de 340bp	73
Figura 16. Electroforesis de PCR convencional para el gen bla _{NDM} de 512bp	74

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

ORAs: Organismos Resistentes a los Antibióticos

BLEES: Betalactamasas de espectro extendido

MBL: Metalobetalactamasa

UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa

HNAAA: Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo

UCI: Unidad de cuidados intensivos

TSI: Agar Triple azúcar -Hierro

LIA: Agar lisina Hierro

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

MINSA: Ministerio de Salud

HNAL: Hospital Nacional Arzobispo Loayza

HNGAI: Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CCG: Consejo de Cooperación del Golfo

ONPG: o- nitrofenil- b D- galactopiranosido

LPS: Lipopolisacáridos

BSI: infección del torrente sanguíneo

ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*

ATCC: American Type Culture Collection

MDR: Multidrogoresistentes

PBP: Proteínas de unión a la penicilina

RND: Resistencia-nodulación-división

MFS: Superfamilia de facilitadores principales

SMR: Resistencia a múltiples fármacos pequeños

MATE: Extrusión de múltiples fármacos y toxinas

CAZ: Ceftazidima

CTX: Cefotaxima

AMC: Amoxicilina-Ácido Clavulánico

CAZ/CAZ-CLA: Ceftazidima/ Ceftazidima-Ácido Clavulánico

CTX/CXT-CLA: Cefotaxima/ Cefotaxima-Ácido Clavulánico

IMP: Imipenem

MEM: Meropenem

EDTA-SMA: Ácido etilendiamino tetraacético-Mercaptoacetato de sodio

MICm: Método modificado de inactivación de carbapenemasas

APB: Ácido 3-aminofenilborónico

MIO: Medio de movilidad indol ornitina

TSA: Agar Tripticasa de Soya

TSB: Caldo Tripticasa de Soya

MHA: Agar Mueller Hinton

UFC: Unidad formadora de colonia

TE: Tris-HCl-EDTA pH 7.5

RPM: Revoluciones por minuto

bp: base pair ó pares de bases

TBE: Tris- Ácido bórico -EDTA

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

NDM: New Delhi Metalobetalactamasa

SHV: Sulphydril Variable

TEM: Temoniera

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

RESUMEN

Objetivo: Detectar la presencia de genes: betalactamasas de espectro extendido (TEM Y SHV) y carbapenemasas (NDM Y KPC) en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **Metodología:** El estudio es de tipo observacional, descriptivo; se recolectaron 50 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* procedentes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, las cepas fueron de origen rectal y sistémico aisladas durante el periodo de abril-mayo del 2018. Los métodos fenotípicos utilizados para la detección de BLEE fueron el método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas y el método de disco combinado y para carbapenemasas fueron el método modificado de inactivación de carbapenemasas, la sinergia a doble disco con ácido fenilborónico y la sinergia a doble disco con EDTA asociado a mercaptoacetato de sodio. La detección genotípica se hizo mediante la técnica de PCR convencional. **Resultados:** El análisis fenotípico evidenció que 2% de las cepas en estudio poseían betalactamasas de espectro extendido y 98% carbapenemasas de las cuales 96% fueron positivas para metalobetalactamasas y 2% para enzimas carbapenemasas tipo A; el análisis genotípico evidenció que el 40% de las cepas portaban el gen SHV, 80 % portaba el gen TEM, 84% portaba el gen NDM, 2% portaba el gen KPC, el 4% de las cepas no portaban ninguno de los cuatro genes estudiados, cabe resaltar que dentro de estos resultados también se evidenció que el 16% de las cepas portaban un solo gen, el 48% eran coportadoras de dos genes, el 30% eran coportadoras de tres genes y 2% era coportadora de los cuatro genes. **Conclusiones:** Las cepas en estudio de *K. pneumoniae* del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen son portadoras de los genes TEM, SHV, KPC y NDM, siendo este último el de mayor prevalencia.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, Betalactamasas de Espectro Extendido, carbapenemasas, metalobetalactamasas.

SUMMARY

Objective: Detect the presence of genes: extended spectrum betalactamases (TEM and SHV) and carbapenemases (NDM and KPC) in strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Methodology:** The study is observational, descriptive; 50 isolated strains of *Klebsiella pneumoniae* were collected from Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital, the strains were rectal and systemic isolated during the period of April- May 2018. The phenotypic methods used for the detection of ESBL were the method based on the use of beta-lactamase inhibitors and the combined disc method, and for carbapenemases were the modified method of inactivation of carbapenemases, double synergy disc with phenylboronic acid and double disc synergy with ethylenediaminetetracetic acid associated with sodium mercaptoacetate. The PCR technique was used for genotypic detection. **Results:** The phenotypic analysis showed that 2% of the strains under study had extended spectrum betalactamases and 98% carbapenemases of which 96% were positive for metallobetalactamases and 2% for type A carbapenemases enzymes; genotypic analysis showed that 40% of the strains carried the SHV gene, 80% carried the TEM gene, 84% carried the NDM gene, 2% carried the KPC gene, 4% of the strains did not carry any of the four genes studied, it should be noted that within these results it was also shown that 16% of the strains carried a single gene, 48% were co-carriers of two genes, 30% were co-carriers of three genes and 2% were co-carriers of the four genes. **Conclusions:** The strains under study from *K. pneumoniae* of Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital are carriers of the TEM, SHV, KPC and NDM genes, being the latter the most prevalent.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Extended Spectrum Betalactamases, carbapenemases, metallobetalactamases.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel hospitalario se han acrecentado las infecciones ligadas a cepas bacterianas resistentes a antibióticos, es así como la resistencia bacteriana ha llegado a ser un problema para la salud pública mundial, ya que en estas cepas la eficacia de los antibióticos disminuye y consecuentemente la terapéutica se hace cada vez más escasa.^{1,2} En su gran mayoría la resistencia a los antibióticos betalactámicos se debe a la producción de enzimas que los hidrolizan y su gran capacidad de diseminación se debe a los genes de resistencia que las codifican, ya que estos se encuentran inmersos en elementos genéticos móviles, los cuales llegan a provocar graves brotes a nivel clínico.³

Entre los organismos que están más involucrados en las infecciones nosocomiales se encuentran las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, de las cuales *K. pneumoniae* destaca como una bacteria oportunista la cual causa una serie de infecciones tales como la neumonía, enteritis, infección del tracto urinario y lesiones sépticas diversas, como sinusitis, meningitis, otitis y otros.^{4,5}

La resistencia mediante la producción de enzimas tipo BLEE es la más común y de importancia en salud pública, dentro de las de mayor prevalencia se encuentran las de tipo SHV y TEM, estas enzimas disminuyen la eficacia de antibióticos betalactámicos de uso frecuente como las penicilinas además de las últimas generaciones de cefalosporinas; se han notificado múltiples brotes por *K. pneumoniae* productora de estas enzimas tipo BLEE durante las dos últimas décadas, las cuales han afectado generalmente a pacientes ingresados en áreas de alto riesgo.^{6,7}

Actualmente *K. pneumoniae* también es productora de carbapenemasas, siendo las enzimas más frecuentes las de tipo KPC y NDM, las cuales han tomado gran importancia en el mundo por su rápida diseminación, su difícil control y por la escasez de opciones terapéuticas, ya que los carbapenemes son antibióticos betalactámicos considerados de última línea en infecciones nosocomiales muy graves; la efectiva capacidad de diseminación de estas carbapenemasas radica en los genes que las codifican ya que estos están localizados en transposones e integrones que se movilizan fácilmente entre especies bacterianas.^{8,9}

En el HNGAI existen pocos estudios sobre la genética de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos betalactámicos, por lo que se hace imprescindible que se realice un estudio para confirmar la presencia de aquellos genes resistentes y de fácil diseminación como los expuestos anteriormente (bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{KPC}, bla_{NDM}), de esta manera se contribuirá con brindar información a las autoridades pertinentes sobre la genética de *K. pneumoniae* del hospital, de modo que pueda generarse medidas preventivas para evitar la diseminación de esta bacteria portadora de genes resistentes. Asimismo, los resultados podrán orientar a la toma de una decisión más acertada cuando se administren los antibióticos a los pacientes que tienen enfermedades ocasionadas por esta bacteria resistente, es así como se podrá disminuir el porcentaje de mortalidad, morbilidad y de costos en infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* resistente a betalactámicos.

.

II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Hipótesis

Las cepas clínicas en estudio de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen presentan los genes de resistencia betalactamasas de espectro extendido (TEM y SHV) y carbapenemasas (KPC y NDM).

2.2 Variables

2.2.1 Variable dependiente

Cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae*.

2.2.2 Variable independiente

Genes betalactamasas de espectro extendido:

- Gen TEM
- Gen SHV

Genes carbapenemasas:

- Gen KPC
- Gen NDM

III. OBJETIVO

3.1 Objetivo general:

- Detectar la presencia de genes: betalactamasas de espectro extendido (TEM Y SHV) y carbapenemasas (NDM Y KPC) en cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar la detección fenotípica y genotípica de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *K. pneumoniae*.
- Realizar la detección fenotípica y genotípica de carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae*.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Antecedentes

4.1.1 Antecedentes Internacionales

- TEM Y SHV

Las variaciones en los genes bla_{TEM-1}, bla_{TEM-2} y bla_{SHV-1} dan como resultado betalactamasas espectro extendido, las cuales han sido reportadas por Philippon en 1989 donde identifica genes con una única sustitución a nivel de aminoácidos del gen bla_{SHV-1} y genes estrechamente relacionados con bla_{TEM-1} y bla_{TEM-2}, estas variaciones le conferirían a las enzimas ampliar su espectro de resistencia antibiótica hasta cefalosporinas de amplio espectro.^{10, 11, 12}

Akpaka P. et.al. en el 2010 reportaron un estudio sobre la identificación molecular de subtipos de BLEE prevalentes en dos especies bacterianas, dentro de estas *K. pneumoniae* en un hospital de Trinidad y Tobago, de mayo del 2005 a abril del 2008, se utilizó el Sistema MicroScan para determinar cepas resistentes o con resistencia intermedia a cefalosporinas de tercera generación y para la identificación fenotípica usaron el método de E-test, debido a su sensibilidad a pesar de ser muy costoso, es así como se reportaron 65 cepas de *Klebsiella pneumoniae* con un CMI ≥ 8 resultado que las señalaba como productoras de BLEE; mediante la técnica de PCR se pudo confirmar que 84.3% de las cepas portaban el gen bla_{TEM} y 34.5% bla_{SHV}, siendo el primero el de mayor prevalencia. En este estudio el autor señala que esta resistencia es debido a la presión del uso inapropiado y extenso de cefalosporinas en el hospital y en el país, estos resultados también nos indican que la prueba genotípica confirma de manera certera los resultados que se pueden encontrar en las pruebas fenotípicas, ambos tipos de pruebas son importantes para determinar si una cepa es productora de BLEE.¹³

Pantoja K. et.al. en el 2015 identificaron los genes que codifican a las betalactamasas que producían resistencia antibiótica en tres especies bacterianas, una de ellas *K. pneumoniae*. En el periodo de un año obtuvieron 107 cepas de *K. pneumoniae* de pacientes internados en una clínica de tercer nivel en Bogotá; para la identificación fenotípica se siguió el método americano, por otro lado los genes se identificaron mediante la técnica de PCR; los resultados fenotípicos indicaron que 33.17% (31) de cepas de *K. pneumoniae* eran productoras de BLEE y los genes

implicados en su codificación fueron los genes bla_{TEM} (64.5%) y bla_{SHV} (80.6%), siendo bla_{SHV} el de mayor prevalencia en este estudio.¹⁴

Flores C. et.al. en el 2016 evaluaron el perfil de susceptibilidad utilizando el sistema VITEK 2 y el porcentaje de resistencia por PCR en aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE, asimismo trataron de identificar si existía alguna relación clonal entre las cepas a través de ERIC-PCR, el estudio se llevó a cabo en una unidad de cuidados intensivos de Rio de Janeiro, los resultados revelaron que aproximadamente 60% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* eran resistentes a ceftriaxona y aproximadamente 96% era resistente a ceftazidima; el gen bla_{SHV} (67.14%) fue superior en porcentaje al gen bla_{TEM} (62.8%), no se estableció una relación clonal entre las cepas.¹⁵ Los genes que codifican para BLEE de mayor prevalencia en este estudio también fueron bla_{TEM} y bla_{SHV}, lo cual resalta la importancia de conocer si estas mismos porcentajes encontrados en diferentes estudios prevalecen en nuestro país.

Nepal K. et.al. en el 2017 publicaron un estudio transversal cuyo objetivo fue detectar BLEE y metalobetalactamasas en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* de mayo a diciembre del 2015, provenientes de un Hospital y Centro de Investigación OM en Nepal, se recolectaron un total de 39 cepas de *K. pneumoniae*; en este estudio también se utilizó el método americano para la identificación fenotípica de BLEE y para detectar metalobetalactamasas se utilizó el método de disco combinado con imipenem e imipenem asociado a etilendiaminotetraacético. En este estudio se tenían 33 cepas de *K. pneumoniae* sospechosas de producir BLEE ya que en el perfil de susceptibilidad mostraban resistencia a antibióticos de tipo cefalosporinas de tercera generación; las pruebas de disco combinado confirmaron que solo 15 cepas eran productoras de BLEE, lo cual resalta la importancia de aplicar estas pruebas a cepas sospechosas de BLEE identificadas en el perfil de susceptibilidad.¹⁶

- KPC Y NDM

La mortalidad de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem ha sido descrita entre los pacientes infectados como alta ya que las opciones de antibióticos para su tratamiento son limitadas. La rápida diseminación varía geográficamente y por tipo de carbapenemasas, las carbapenemasas de mayor diseminación reportadas son las serinocarbapenemasas pertenecientes al grupo A de Ambler como bla_{KPC} y las del grupo B, llamadas metalobetalactamasas, como bla_{NDM}.^{17, 18}

Yigit H. et.al. en el 2001 reportaron el gen KPC-1 en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte, los datos presentados en el estudio muestran que KPC-1 es el principal responsable de la resistencia a carbapenem de la cepa aislada en un hospital de Carolina del Norte en el año de 1996;¹⁹ pero la primera betalactamasa capaz de hidrolizar a los carbapenemes fue reportada en 1994 en un estudio en Japón donde se aisló una cepa de *K. pneumoniae* tipo metalobetalactamasa (clase B en la clasificación de Amber).¹¹

A partir del 2001 se han ido reportando estudios de la identificación del gen bla_{KPC} en Estados Unidos, como Bratu S. et.al en el 2005 que investigaron la epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem en 10 Hospitales Brooklyn, mediante la técnica de PCR e identificaron 95 cepas de 96 como productoras de carbapenemasas (98.95%).^{20,21,22}

Villegas M. et.al. en el 2006 reportaron por primera vez en Sudamérica la identificación del gen bla_{KPC} en dos aislamientos de *K. pneumoniae* en dos hospitales de Colombia, los resultados confirmaron la presencia de carbapenemasas KPC-2 en ambos aislamientos los cuales no estaban relacionados, este reporte es el segundo en publicarse luego de la primera identificación de carbapenemasas KPC en Estados Unidos, los autores concluyen que la expansión de las carbapenemasas tipo KPC resalta la importancia clínica de la identificación de estas enzimas y que la detección molecular será crucial para controlar su propagación aún más en aquellos aislamientos que permanecen susceptibles a carbapenem in vitro.²³

Marcano D. et.al. en el 2009 investigaron aislamientos de enterobacterias resistentes a betalactámicos, las cepas fueron obtenidas de 8 hospitales en

Caracas; se analizaron 1235 aislamientos, las especies se identificaron a través de pruebas bioquímicas, la susceptibilidad fue evaluada por el método de Kirby-bauer, el patrón fenotípico por el método de Hodge y los genes de resistencia a betalactámicos fueron detectados mediante la técnica de PCR; este estudio reportó la presencia de 1.9% carbapenemasa tipo KPC, siendo la *K. pneumoniae* segunda en frecuencia.²⁴

Iregui A. et.al. en el 2018 reportaron que en el 2017 realizaron un estudio de vigilancia epidemiológica para conocer la prevalencia de bla_{KPC} en seis hospitales de Brooklyn, durante tres meses recolectaron 533 cepas de *K. pneumoniae*, de las cuales mediante la técnica de PCR encontraron 22 cepas que portaban el gen bla_{KPC} lo cual representa el 4.12% del total de cepas recolectadas. Según los autores la disminución de aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes se debe a múltiples factores estos señalan que la vigilancia continua en tiempo real tanto en Hospitales de cuarto nivel y centros de primer nivel es necesaria para identificar y limitar la propagación de esta enterobacteria multirresistente a fármacos por producción de carbapenemasas.²⁵

Ferreira RL. et.al en el 2019 publicaron un estudio en el cual investigaron el perfil de resistencia antibiótica, el potencial patogénico y relación clonal de 25 cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes pertenecientes a una unidad de cuidados intensivos de un hospital en Brasil. Mediante la técnica de PCR se reportó que el 100% de las cepas portaban el gen bla_{KPC}, 100% el gen bla_{TEM}, 24.6% el gen bla_{SHV}, 84% el gen bla_{CTX-M-1}, no se detectaron genes bla_{NDM}. Los patrones de ERIC-PCR obtenidos revelaron que la similitud entre los aislamientos era superior al 70%. A parte de los genes convencionales que codifican para carbapenemasas se identificaron genes relacionados con otros mecanismos de resistencia a carbapenem (bombas de eflujo y pérdida de porinas), además de factores de virulencia, estos tuvieron una alta prevalencia genética en las cepas estudiadas.²⁶

Dentro de las carbapenemasas de Clase B ó también llamadas metalobetalactamasas, el gen bla_{NDM} es una de las más importantes clínicamente y ha sido identificada en enterobacterias, dentro de las cuales se encuentra *K. pneumoniae*.²⁷

Yong D, et.al. en el 2008, identificaron el gen *bla*_{NDM-1} como una nueva metalobetalactamasa aislada en un hospital de Suecia de un paciente de origen indio donde se demostró que el aislado de *K. pneumoniae* procedente del tracto urinario poseía una metalobetalactamasa (MBL) negativa para los genes conocidos.²⁸

Castanheira M, et.al. en el 2010 publicaron un estudio que analizó un total de 1443 de enterobacterias recolectadas de 14 hospitales en India entre el 2006-2007, todos los aislamientos que tenían una sensibilidad reducida a imipenem, meropenem o ertapenem (CMI, ≥ 2 µg/ml), se examinaron para determinar la producción de carbapenemasas, estos fueron secuenciados por PCR para los genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC} y *bla*_{OXA-48}; 15 cepas productoras de carbapenemasas fueron identificadas como portadoras del gen *bla*_{NDM-1}, dentro de las cuales seis pertenecían a *K. pneumoniae*.²⁹

Seara N. et.al en España en el 2015 reportaron la presencia de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa NDM-7, en siete pacientes de tres hospitales diferentes, esta metalobetalactamasa fue aislada de muestras de diferente origen sistémico (orina, sangre) y de hisopado rectal; para la identificación molecular de los genes de resistencia se utilizó PCR Multiplex en tiempo real.³⁰

Liu Y. et.al. en el 2015 investigaron un total de 18 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes procedentes de pacientes internados en un hospital de China, el método de disco combinado con EDTA fue uno de los métodos empleados para la identificación fenotípica y la técnica de PCR se usó para la identificación genotípica. En la prueba de susceptibilidad 83,3% fue resistente al aztreonam, 72,2% a la amoxicilina / ácido clavulánico y 55,6 % a ceftazidima, el método fenotípico mencionado dio positivo para todos los aislamientos (100%). Los resultados de PCR identificaron ocho productores de KPC-2, cuatro NDM-1, uno VIM-2 y cinco KPC-2 más IMP-4, todos resistentes a múltiples fármacos debido a la presencia de otros determinantes de resistencia, incluidos BLEE (CTX-M-15, SHV-12).³¹

Pereira P. et.al en el 2015 reportaron por primera vez la presencia de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{NDM-1} transportadas por plásmidos, pero en una cepa de *Enterobacter*

hormaechei subps. Oharae en Brasil, la detección de carbapenemasas fue realizada por métodos fenotípicos, PCR y secuenciación de ADN. El autor refuerza la idea que se deben tomar medidas urgentes para evitar la propagación de estos genes multirresistentes a nivel hospitalario.³²

Wei D-D, Wan L-G, Liu Y en el 2018 reportaron la coproducción de los genes *bla_{NDM}* y *bla_{KPC}* en un aislamiento de *K. pneumoniae* procedente de una secreción de herida de un paciente quemado de 58 años internado en un Hospital de China, esta cepa resultó resistente a todos los antibióticos clínicamente usados ertapenem, meropenem e imipenem, además de fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y macrólidos. De igual manera se identificaron genes codificadores de factores de virulencia como *rmpA* (regulador del gen fenotipo mucoide A), *rmpA2*, *iroN*, aerobactina y *mrkD*.³³

Li J. et.al en el 2019 estudiaron el rendimiento de métodos fenotípicos usados en la detección y diferenciación de carbapenemasas (serinocarbapenemasas y metalobetalactamasas), los métodos en evaluación fueron: el método de modificado de inactivación de carbapenem (MICm) junto con el método de inactivación de carbapenem combinado con EDTA (MICe) y el método de disco combinado con inhibidores (TDC). Se analizaron un total de 101 enterobacterias las cuales tenían los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* y *bla_{OXA-48}*. Los resultados evidenciaron que la tasa de coincidencia para MICm y MICe fue 97.5% (77/79) y para TDC fue de 96.2% (76/79) comparándolos con la detección de los genes en PCR, la mayoría de los genes identificados fueron de tipo *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* y la bacteria más frecuente fue *K. pneumoniae* (42/79). Este estudio demostró que ambos métodos fenotípicos muestran una alta concordancia con la PCR cuando las cepas solo portan un gen, pero se evidenció una cepa de la especie de *Klebsiella oxytoca* que co-portaba los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, fue en esa cepa donde ambos métodos fenotípicos no fueron eficaces para su identificación. El estudio resalta que los métodos fenotípicos sometidos a evaluación presentan una alta sensibilidad y especificidad en la distinción de serinocarbapenemasas y metalobetalactamasas (>95%) con otras ventajas como el bajo costo y la facilidad de interpretación.³⁴

Tekeli A. et.al. en el 2019 describieron las características de aislados de *K. pneumoniae* co-productora de carbapenemasas KPC y NDM de pacientes hospitalizados en Turquía, estos aislamientos se caracterizaron por poseer resistencia a colistina y altos niveles de resistencia a aminoglucósidos. Los resultados expresaron que, de los 10 aislamientos, seis de las cepas coproductoras de NDM y KPC eran resistentes a colistina, dos exhibieron resistencia intermedia a tigeciclina, dos fueron resistentes a tigeciclina y solo dos cepas fueron susceptibles a ambos antibióticos. Además de ser productoras de KPC y NDM, las 10 cepas también codificaban para los genes *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* (BLEE).³⁵

4.1.2 Antecedentes Nacionales

- TEM Y SHV

Calderón R. et.al. en el 2003 estudiaron aislados de *K. pneumoniae* procedentes de una unidad de cuidados intensivos neonatal del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé en Lima, durante dos meses recolectaron seis cepas aisladas de *K. pneumoniae* de muestras de neonatos con signos de sepsis o neumonía, a través de la prueba fenotípica de disco difusión se determina que todas las cepas eran productoras de BLEE; mediante la técnica de isoelectroenfoque se demostró que la actividad betalactamasas pertenecía al gen *bla_{SHV-5}*.³⁶

Morales J. et.al. reportaron en el 2005 un estudio que buscaba detectar la producción de enzimas BLEE tipo SHV y TEM en bacterias clínicas *E. coli* y *K. pneumoniae* de dos hospitales de lima (“Guillermo Almenara Irigoyen” y “Edgardo Rebagliati Martins”), en tres meses aislaron 18 cepas de *K. pneumoniae* de las cuales el 44.4% presentaba resistencia a ceftazidima y el 38.9% resistencia a ceftriaxona en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, este resultado se confirmó en la prueba fenotípica ya que el 44.4% se reportaron como productoras de BLEE mediante el método de sinergia de doble disco y mediante la técnica de PCR se confirmó la presencia de 3 cepas portadoras del gen *bla_{TEM}* y de igual manera para el gen *bla_{SHV}*; la secuenciación reveló que los subtipos implicados fueron *bla_{TEM-10}* y *bla_{SHV-5}*. Este estudio revela que estos dos tipos de genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}* en el 2005 ya estaban dentro de la epidemiología genética de las bacterias circulantes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.³⁷

Lezameta L. et.al en el 2009 mediante un estudio comparativo de corte transversal investigaron la eficacia de cuatro pruebas fenotípicas que identifican a cepas productoras de BLEE, en total aislaron 147 cepas procedentes del INSN de las cuales en la prueba de tamizaje 43 (29,3%) fueron sospechosas de BLEE; cabe resaltar que del total de cepas aisladas 11 eran de la especie *K. pneumoniae*. La evaluación del método de Jarlier, mostró una sensibilidad y especificidad de 100%; los métodos de Hodge y Tridimensional tuvieron una sensibilidad y especificidad de 85,2 % y 100%, respectivamente;³⁸ siendo el Método de Jarlier la prueba fenotípica de mayor frecuencia en uso, con alta sensibilidad, de bajo costo y de fácil de interpretación.

Rivera M. et.al. en el 2015 realizaron un estudio en el Hospital Regional de Lambayeque con el objetivo de detectar BLEE en *Klebsiella pneumoniae* y *E.coli* aisladas de superficies inanimadas del hospital, durante 10 meses aislaron un total de 19 cepas de *K. pneumoniae* procedentes de mesas, lavatorios, mesas entre otras superficies pertenecientes a los servicios del hospital, la prueba genotípica la realizaron por PCR utilizando los mismos cebadores del estudio de Morales J. et.al. es así como identificaron a 7 cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen bla_{TEM} (36.8%). Este estudio revela que *K. pneumoniae* es capaz de sobrevivir sobre las superficies y por lo tanto posee una alta transmisibilidad además de ser una cepa portadora de genes tipo BLEE, lo cual agrava la situación de los hospitales, convirtiéndola en un contratiempo de principal urgencia a resolver debido la facilidad de diseminación de estos genes y las consecuencias que puede acarrear como la contaminación entre pacientes, personal de salud y brotes epidemiológicos.³⁹

El INSN en el 2015 investigó la prevalencia de genes tipo BLEE en cepas de *K. pneumoniae*, en el método fenotípico utilizaron el método de Jarlier y molecularmente detectaron los genes por PCR, los resultados indicaron un mayor porcentaje para el gen bla_{SHV} de 45% sobre el gen bla_{TEM} que obtuvo un 44.4%. Siendo estos resultados de gran importancia ya que reportaron al gen bla_{TEM} prevalente sobre el gen bla_{SHV}.⁴⁰

Grandez JA. et.al. en el año 2018 realizaron un estudio de mapeo microbiológico en el Hospital Alberto Sabogal Sologuren, en donde se recolectaron bacterias

aisladas en urocultivos positivos, las cuales fueron procedentes del servicio de Urología. Las diferentes bacterias que se recolectaron fueron del año 2013, 2014 y 2015. Las bacterias aisladas fueron *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y otros. Las bacterias aisladas que dieron BLEE positivo fueron *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*. En las cepas del 2013 se encontró que 70.28% de *K. pneumoniae* eran productoras de enzimas tipo BLEE; en las del año 2014 se encontró 72.31% y en las del 2015 se encontró 59.32%.⁴¹

- KPC Y NDM

Según la OPS/OMS en el informe del perfil de resistencia a antimicrobianos realizado en el año 2009 en Perú con respecto a aislamientos de *K. pneumoniae* se informa que, en pacientes hospitalizados, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación hallada en este reporte supera el 67% y no se reportaban aún aislamientos resistentes a carbapenemes.⁴²

El MINSA en el 2012 reportó cepas hospitalarias de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en un 50% aproximadamente y un 0.4% de resistencia a imipenem (4/993). La resistencia se determinó según la susceptibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.^{43, 44}

Velasquez J. et.al reportaron el primer caso de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemes en Hospital Nacional Arzobispo Loayza en el año 2013 en un paciente internado en la Unidad de Cuidados Intensivos confirmándose a la cepa aislada como la primera enterobacteria portadora del gen bla_{KPC} en el Perú.⁴⁵ Otro estudio realizado por Horna G. et.al en el 2016 concluyeron que la primera cepa de *K. pneumoniae* era de la variante bla_{KPC-2} perteneciente a CC258, clon multirresistente de alto riesgo.⁴⁶

Resurrección C. et.al. en el 2016 realizaron un estudio descriptivo en el Hospital Nacional Dos de Mayo, se identificaron 9 aislamientos de *K. pneumoniae* y los métodos fenotípicos usados para el descarte de carbapenemasas fueron, el test de Hodge modificado y el método de sinergia con los inhibidores APB y EDTA, todas las cepas resultaron positivas en el método de sinergia con EDTA y negativas para los otros dos métodos mencionados; seguidamente se optó como técnica alternativa el MIC (Método de inactivación de carbapenem) la cual dio positiva para

la producción de carbapenemasas en todas las cepas, las cepas fueron identificadas molecularmente por PCR como productoras del gen bla_{NDM}. Los autores recalcan que el método de Hodge Modificado tiene una sensibilidad y especificidad muy baja para identificar metalobetalactamasas tipo NDM.⁴⁷

Sacsquispe R. et.al en el 2017 realizaron un estudio sobre la identificación de genes que codifican para enzimas carbapenemasas tipo KPC y también metalobetalactamasas en enterobacterias pertenecientes a 12 hospitales del país entre 2013-2017, el método fenotípico usado para la detección presuntiva de estas enzimas fue la sinergia a doble disco con APB y EDTA y los genes se detectaron mediante PCR convencional. Los resultados expresaron que las cepas provenían de distintas fuentes como orina, aspirado bronquial, secreción de herida, catéter venoso central, absceso, secreción de dren, entre otros, se identificaron 83 cepas resistentes a carbapenemes de las cuales 55 pertenecían a *K. pneumoniae*, dentro de estas 14 portaban el gen bla_{KPC}, 40 portaban el gen bla_{NDM} y una cepa portaba el gen bla_{IMP}, siendo este el primer reporte en el Perú que da a conocer los genes de carbapenemasas en diferentes hospitales del Perú.⁴⁸

En esta revisión bibliográfica se evidencia como se han ido propagando los genes resistentes tipo BLEE y carbapenemasas de *K. pneumoniae* a nivel mundial siendo considerados algunos de estos tipos de genes como los de mayor incidencia generando un aumento de la morbilidad y mortalidad en el paciente.

4.2 Base teórica

4.2.1 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un grupo de bacterias que presentan las siguientes características: son bacilos gramnegativos, no esporulados, fermentan glucosa, sin actividad de citocromooxidasa, reducen nitratos a nitritos y metabólicamente son anaerobios facultativos. En el ser humano se encuentran frecuentemente en el intestino, también se las puede localizar en la piel, en la uretra anterior y en menor proporción en las vías aéreas superiores; está conformada por más de 30 géneros.⁴⁹

Las principales enterobacterias que han sido reportadas en aislados clínicos son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia pestis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Shigella flexneri* y *Edwardsiella tarda*.⁵⁰

4.2.1.1 *Klebsiella pneumoniae*

4.2.1.1.1 Taxonomía

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, taxonómicamente se las puede clasificar según lo siguiente: (Tabla 1)⁵¹

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Klebsiella pneumoniae*

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genero	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Adaptado de Huertas et.al⁵¹

K. pneumoniae es una bacteria entérica que se encuentra en el tracto intestinal y es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, también se caracteriza por causar infecciosas oportunistas y presentar una alta resistencia a los antibióticos betalactámicos debido a varios mecanismos de resistencia, uno de los más importantes es la producción de enzimas

betalactamasas. Taxonómicamente se reconocen 9 especies en el género *Klebsiella*: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola*, *K. granulomatis*, *K. aerogenes*, *K. senegalensis*, *K. singaporensis*, *K. milletis* y *K. alba*, especies usualmente aisladas a nivel medio ambiental, en humanos y animales.⁵²

4.2.1.1.2 Características microbiológicas

K. pneumoniae es un bacilo recto, de 0,3-1,0 μm de diámetro y 0,6-6,0 μm de longitud, es gram negativo, inmóvil, metabólicamente es una bacteria anaeróbica facultativa, oxidasa negativa y catalasa positiva.^{14,53}

La identificación de *K. pneumoniae* se realiza en un medio selectivo el cual es el Agar Mac Conkey, en este medio se observan colonias grandes de color rojo a causa de la fermentación de lactosa que produce la bacteria, además se evidencia que las colonias presentan una consistencia mucoide, las cuales se deben a que *K. pneumoniae* presenta una cápsula de polisacáridos.^{14, 54}

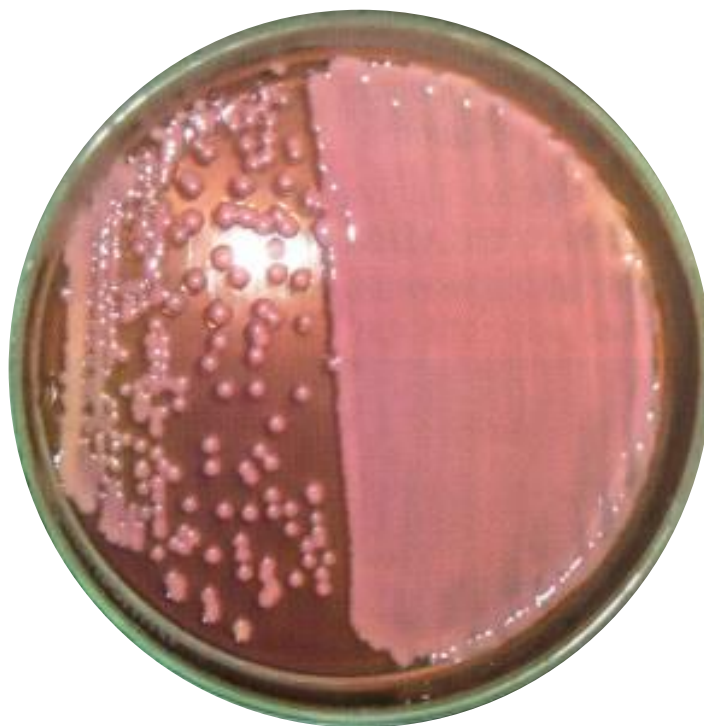


Figura 1. Colonias de *Klebsiella pneumoniae* en Agar Mac Conkey

Adaptado de Padilla et.al⁵⁴

Las pruebas bioquímicas que son indicadas para la identificación de *K. pneumoniae* se describen a continuación en la Tabla 2.^{5, 55, 56, 57}

Tabla 2. Propiedades Bioquímicas en *K. pneumoniae*

Pruebas bioquímicas	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Glucosa (Producción de gas)	+
Fermentación de Lactosa 24h	+
Movilidad	-
Urea	+
Indol	-
Voges -Proskauer	+
ONPG*	+
Citrato de Simmons	+
DNasa(25°C)	-
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	-
KCN descarboxilasa	+
Rojo de metilo	-

*ONPG: o- nitrofenil- b D- galactopiranosido, KCN: cianuro de potasio

Adaptado de Padilla et.al⁵⁴

4.2.1.1.3 Hábitat / patogenicia

K. pneumoniae se aísla frecuentemente en las vías respiratorias altas, en la flora intestinal y en la piel. El factor de riesgo más importante para la colonización y riesgo de sufrir un proceso infeccioso causado por *K. pneumoniae* son las personas que son inmunodeprimidas como es el caso de los neonatos, ancianos y pacientes de UCI.⁵⁷

El principal reservorio de *K. pneumoniae* lo conforma el tracto gastrointestinal, por otro lado las manos del personal hospitalario es considerado como un vehículo de transmisión, debido a la gran capacidad de diseminarse esta bacteria puede causar brotes nosocomiales.¹⁴

Las infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* tienden a ser crónicas debido a dos razones principales: Por la presencia de biofilms de *K. pneumoniae* producidos *in vivo* lo que les da la capacidad de protegerse de la respuesta inmune

del huésped y de los antibióticos, la otra razón incluye a aquellas cepas de *K. pneumoniae* que muestran fenotipos de resistencia a múltiples fármacos que generalmente son causados por la presencia de betalactamasas de espectro extendido o carbapenemasas, lo que dificulta la elección de los antibióticos adecuados para el tratamiento.^{18, 58, 59}

4.2.1.1.4 Factores de Virulencia

Klebsiella pneumoniae se vuelve en patógeno cuando llega a tejidos normalmente estériles y produce enfermedades infecciosas en pacientes con un sistema inmunodeficiente, varios factores le permiten ejercer su ingreso y poder multiplicarse dentro del hospedero, mantenerse dentro de él y evadir al sistema inmune.^{51, 60}

a) Polisacárido capsular

Las cepas de *K. pneumoniae* tienen por lo general una cápsula, la capa más externa está conformada por una cadena de 4 a 6 monosacáridos y ácido urónicos.⁷⁷ Esta cápsula es fundamental ya que permite evadir el sistema inmune del hospedador, la protege de la desecación, de la opsonofagocitosis y consecuentemente inhibe la activación del complemento (C3b).⁸⁵ La cápsula de *K. pneumoniae* se puede clasificar en 77 serotipos diferentes, siendo algunos serotipos más virulentos que otros (K1, K2, K4 y K5), esto se debe generalmente al aumento de la producción de polisacárido capsular y a la presencia de genes de virulencia específicos, como *rmpA*.⁶¹

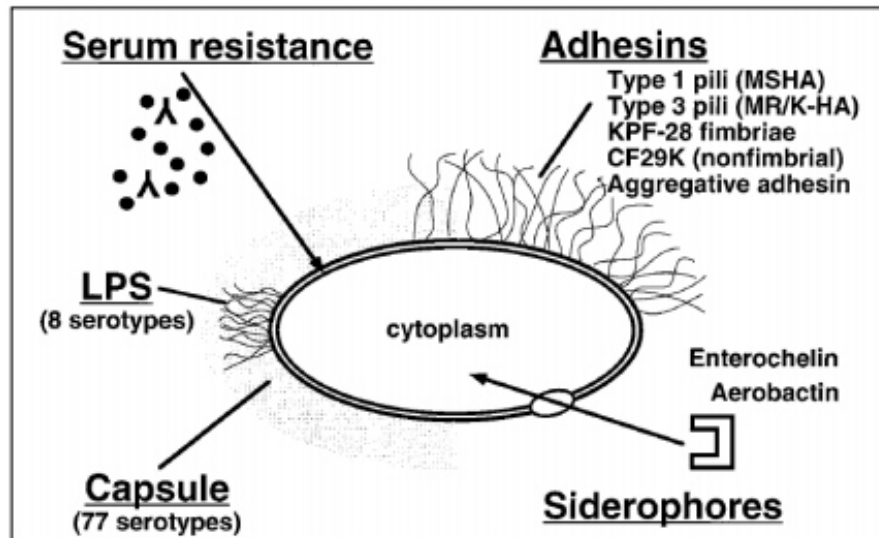


Figura 2. Representación de factores involucrados en la virulencia de *Klebsiella pneumoniae*.

Adaptado de Cubero et.al⁶⁵

b) Lipopolisacáridos (LPS)

Otro factor de virulencia son los lipopolisacáridos que conforman la superficie externa de una bacteria gram negativa, la detección de lipopolisacáridos libera una cascada inflamatoria en el organismo huésped y se ha demostrado que es el principal responsable de la secuela en la sepsis y el shock séptico. Los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de *K. pneumoniae* tienen como función formar la estructura de la bacteria, asimismo brindarle inmunidad debido a que la protege de los antibióticos y favorece su adhesión. Este factor de virulencia está constituido por tres dominios: el antígeno O, el Lípido A y un núcleo de oligosacáridos (Figura 3).⁶³

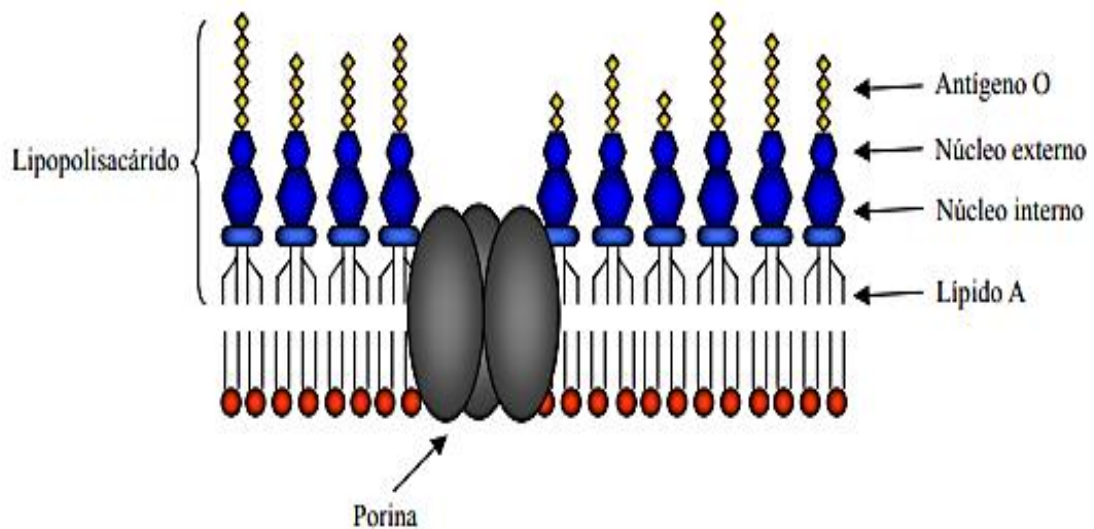


Figura 3. Estructura y disposición del LPS en bacterias Gram negativas.

Adaptado de Izquierdo et.al.⁶³

El dominio que elude la respuesta inmunitaria innata estimulando la activación de los macrófagos con consecuente respuesta inflamatoria y pirógena es el lípido A.^{77,88} El principal dominio que genera resistencia al complemento y de protección frente a la fagocitosis es el antígeno O; *K. pneumoniae* presenta el serotipo O1, el cual está constituido por D-Galactano I y II, adicionalmente dentro de la bacteria este antígeno cumple la función de mantener la integridad y la permeabilidad de la membrana externa.⁶⁴

c) Estructuras de adhesión

Este factor de virulencia se ubica en la superficie bacteriana y está formado por fimbrias proteicas.⁵¹ En *K. pneumoniae* se encuentran fimbrias de tipo 1 y 3, las cuales permiten que la bacteria se adhiera a las células huésped.^{60,65} Las fimbrias de tipo 1 se caracterizan por generar canales, ser gruesas (5-7 nm de diámetro) y por tener en su estructura la adhesina *fimH*, asimismo están relacionadas a infecciones del tracto urinario ya que se adhieren a las células del túbulo proximal.⁶⁶ Por otro lado, las fimbrias tipo 3 no generan canales y son más delgadas (2-5 nm de diámetro), estas se adhieren a las células endoteliales del tracto respiratorio y urinario; mediante ensayos *in vitro* se ha demostrado su adhesión a la superficie de órganos como el hígado, los pulmones y la vejiga.⁶⁷

d) Sideróforos

Los sideróforos captan el hierro en condiciones donde este metal se encuentra en niveles bajos dentro del hospedero; para el desarrollo bacteriano es muy importante captar el hierro, por eso la mayoría de las bacterias lo obtienen produciendo agentes quelantes denominados sideróforos los cuales son capaces de unirse a las proteínas del hospedero. En *Klebsiella sp.* se ha evidenciado dos tipos de sideróforos, la enterobactina fenolato, la cual permite obtener el hierro de la transferrina y la aerobactina hidroxiamato, de menor frecuencia y cuya fuente se encuentra en las células del hospedero.^{51, 68}

4.2.1.1.5 Importancia Clínica

K. pneumoniae coloniza las superficies de la mucosa humana de la orofaringe y el tracto gastrointestinal, una vez que la bacteria se vuelve patógena, puede mostrar altos niveles de virulencia y resistencia a los antibióticos.^{4, 11}

Esta bacteria causa un espectro de enfermedad que incluye neumonía grave, enteritis, infección del tracto urinario y lesiones sépticas diversas, como sinusitis, meningitis, otitis, infección intraabdominal, infección del torrente sanguíneo, y absceso hepático piógeno.^{69, 55} Las infecciones a nivel hospitalario están asociadas a diversos factores de riesgo, siendo frecuentes en pacientes con estancias hospitalarias extendidas o que hayan sido sometidos a técnicas invasivas.⁵¹ Asimismo, los pacientes que presentan inmunodepresión como se da en el caso de la diabetes mellitus o cáncer, también presenta un riesgo de que la bacteria pueda generar una infección; por otro lado otros factores como una edad muy temprana o avanzada, terapia con agentes antimicrobianos y/o antecedentes de alcoholismo crónico los hace también vulnerables.^{70, 71}

K. pneumoniae forma parte del acrónimo “ESKAPE” (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp*), el cual agrupa a los patógenos multidrogoresistentes (MDR) de mayor preocupación a nivel mundial; así mismo, también está incluida como prioridad crítica en la lista de “patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos”, realizada por la OMS.⁷²

4.2.2 Clasificación de antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son usados en su mayoría para tratar una amplia variedad de infecciones bacterianas, dentro de estos tipos de antibióticos encontramos penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes, antibióticos principales en la terapia farmacológica para infecciones por bacterias gram negativas.⁷³

Los antibióticos betalactámicos tienen una característica común, que es el anillo de tres carbonos y un nitrógeno denominado anillo betalactámico, que es altamente reactivo, estos antibióticos actúan sobre las enzimas denominadas proteínas de unión a la penicilina (PBP) responsables de construir la pared celular bacteriana y al unirse de manera covalente e irreversible, la pared celular bacteriana se rompe y se produce la lisis.⁷⁴

Penicilinas

El primer antibiótico con anillo betalactámico en usarse fue la penicilina G; sin embargo, el incremento de pacientes con estafilococos productores de penicilinasa redujo el uso de este antibiótico e impulsó la búsqueda de penicilinas con mayor eficacia frente a las betalactamasas estafilocócicas. En 1970, se introdujeron la amoxicilina y penicilina destinadas para infecciones causadas por bacterias enteropatógenas; para *Pseudomona aeruginosa* se usaron la carbenicilina y más tarde la ticarcilina y piperacilina, estos dos antibióticos considerados como penicilinas de amplio espectro que incluyen *Staphylococcus* sensible a penicilina, enterobacterias, anaeróbicos y *P. aeruginosa*; usados para tratar infecciones hospitalarias, especialmente cuando son asociadas con inhibidores de betalactamasas.⁷⁵

Cefalosporinas

Descubiertas en 1975, las cefalosporinas son un grupo muy numeroso de antibióticos betalactámicos y se agrupan comúnmente según "generaciones", principalmente en función de su actividad antibacteriana, así como su susceptibilidad a las betalactamasas.⁷⁶

Tabla 3. Clasificación de Cefalosporinas

Clasificación de Cefalosporinas			
Primera Generación	Segunda Generación	Tercera Generación	Cuarta Generación
Cefazolina	Cefamandol	Cefotaxima	Cefepime
Cefalotina	Cefuroxima	Ceftazidima	Cefpiroma
Cefapirina	Cefaclor	Ceftriaxona	Cefozopram
Cefradina	Cefprozil	Cefdinir	Cefpiramide
Cefadrocil	Loracarbef	Cefixime	
Cefalexina	Cefotixina	Cefibuten	
	Cefotetan	Ceftizoxima	
	Cefmetazole	Cefoperazona	
	Ceforanide	Moxalactam	
	Cefonicid	Cefmenoxime	
		Cefpodoximapro xetil	

Adaptado de Bush et.al⁷⁵

Las cefalosporinas de primera generación poseen actividad enfocada principalmente en bacterias grampositivas. Los medicamentos de segunda generación tienen una actividad mejorada contra los bacilos gramnegativos, pero mantienen diversos grados de actividad contra los cocos grampositivos. Las cefalosporinas de tercera generación tienen una potencia notablemente mayor contra los bacilos gramnegativos; sin embargo, para algunos compuestos en este grupo, la actividad contra cocos grampositivos se reduce, entre el grupo de la tercera generación, algunos compuestos, como ceftazidima, se consideran por

separado para la actividad contra *P. aeruginosa*. La cuarta generación tiene el espectro más amplio de actividad, tales antibióticos como el cefepime y la cefpiroma, tienen actividad contra la mayoría de los bacilos gramnegativos, incluida la *P. aeruginosa*, y mantienen su potencia contra los cocos grampositivos; todos estos antibióticos se encuentran resumidos en la Tabla 3.⁷⁷

Carbapenemes

Los carbapenemes son antibióticos bactericidas, los cuales son eficaces en infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE, algunos ejemplos de este grupo de antibióticos son: imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, entre otros; estos han reemplazado en uso a las cefalosporinas ya que se ha evidenciado un aumento de la resistencia en la familia Enterobacteriaceae, por otro lado, los carbapenemes tienen la habilidad de penetrar en canales de porina que son excluyentes para otros tipos de antibióticos.^{77,78} Los carbapenemes son de amplio espectro y actúan contra bacterias gram positivas, gram negativas e incluyendo anaerobios; se encuentra un espectro más amplio de actividad entre los tipos de aminos cíclicos de carbapenems con derivados de pirrolidina como meropenem, doripenem, panipenem y ertapenem;⁷⁹ sin embargo, las carbapenemasas de clase B, así como algunas carbapenemasas poco frecuentes de la clase A (SME, IMI, NMC, GES, KPC) y D (enzimas en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*) son capaces de hidrolizar a los carbapenemes.⁸⁰

Monobactam

Antibiótico natural aislado de *Chromobacterium spp*, a diferencia de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, el anillo betalactámico está solo y no está fusionado con otro anillo. Aztreonam, el único agente disponible en esta clase, se ha modificado químicamente con cadenas laterales y demuestra una actividad gramnegativa comparable con las cefalosporinas de tercera generación, pero sin una actividad anaerobia o grampositiva significativa.⁸¹

4.2.3 Mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*

Según la OMS la resistencia se produce cuando las bacterias como *K. pneumoniae* son expuestas a antibióticos y se produce un cambio en la bacteria, generalmente por modificaciones genéticas que puede conllevar a la falla terapéutica.⁸²

Los principales mecanismos de resistencia de las bacterias gram negativas se agrupan en cinco categorías: 1. Modificación del sitio objetivo (Target) 2. Modificación del antibiótico por acción de enzimas 3. Impermeabilidad de la bacteria 4. Expulsión del antibiótico y 5. Formación de biofilms.^{83, 84}

4.2.3.1 Modificación del sitio objetivo (Target)

Existen sistemas de regulación que incluyen un sensor histidina quinasa y un regulador transcripcional que permiten que los microorganismos detecten cambios en el medio ambiente y se adapten a las nuevas condiciones, es así como se encontró dos sistemas denominados PhoPQ y PmrAB, los cuales eran necesarios en la resistencia adquirida de *Salmonella* en bajas concentraciones de Mg^{+2} . En *S. enterica* serovar *Typhimurium*, la proteína sensorial PhoQ puede detectar la limitación de Mg^{+2} y activar el regulador transcripcional PhoP, el cual luego inducirá la transcripción del operón PmrAB, el cual solo se activa en alto contenido de Fe^{+3} , bajo pH y vanadato; la comunicación entre los sistemas PhoPQ y PmrAB esta mediada por la proteína PmrD que es inducida por PhoP, la proteína PmrD estabiliza la forma fosforilada de PmrA, esta última regula positivamente la modificación del lipopolisacárido a través del operón pmr, el cual limita la interacción con los antimicrobianos cargados positivamente.⁸⁵ En *Klebsiella* la proteína PmrD activa PmrA. Un estudio reciente llevado a cabo en una cepa clínica altamente virulenta de *K. pneumoniae* CG43 demostró cómo la expresión del operón pmr está regulada por PhoP, PmrA y PmrD de manera similar a *Salmonella* y que la proteína PhoP desempeña un papel importante en la resistencia a polimixina B.⁸⁶

4.2.3.2 Modificación del antibiótico por acción de enzimas

La resistencia a los antibióticos betalactámicos en bacterias gramnegativas se produce en mayor cantidad por la expresión de las betalactamasas, estas enzimas producidas por las bacterias hidrolizan a los antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes, impidiendo que estos lleven a cabo su actividad.^{87, 88}

Existen dos tipos de clasificación de betalactamasas, la desarrollada por Bush, Jacoby y Medeiros, basada en las características funcionales de la enzima y en esquemas anteriores y la propuesta por Ambler basada en la estructura primaria de estas enzimas (Tabla 4); esta última clasificación agrupa a las enzimas en 4 clases, las enzimas de tipo A, C y D hidrolizan sus sustratos formando una enzima acilo a través de una serina de sitio activo, por otro lado la clase B o denominadas metaloenzimas utilizan al menos un ion de zinc de sitio activo para facilitar la hidrólisis del antibiótico betalactámico; la clasificación funcional brinda la oportunidad de relacionar estas enzimas con su resistencia selectiva a diferentes clases de antibióticos betalactámicos.^{89,90}

Tabla 4. Clasificación de betalactamasas en bacterias gram negativas, adaptación en *Klebsiella pneumoniae*.

Grupo Funcional (Bush, Jacoby y Medeiros)	Clase Molecular (Ambler)	Nombre Común	Resistencia a Betalactámicos	Enzimas identificadas en <i>Klebsiella pneumoniae</i>
1	C	Cefalosporinasa	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes*, monobactamicos*.	MIR-1, DHA-2
2b	A	Penicilinasa	Penicilinas, cefalosporinas de primera generación, Combinaciones con inhibidores de betalactamasas*.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	BLEE	Penicilinas, cefalosporinas, monobactamicos, combinaciones con inhibidores de betalactámicos.	TEM-3 a 28, SHV-2 a 6, CTX-M-15
2d	D	Cloxacilinas	Penicilinas (incluyendo oxacilina y cloxacilina)	OXA-1
2df	D	Carbapenemasa	Carbapenémicos y otros betalactámicos	OXA-23, OXA-24, OXA-48
2f	A	Carbapenemasa	Todos los betalactámicos	KPC, IMI
3	B	Metalobetalactamasa	Todos los betalactámicos, excepto monobactam.	NDM, VIM, IMP

*Resistencia por alta producción de betalactamasas en combinación con modificación en la bomba de e-flujo y porina

Adaptado de De Jesus et.al⁹⁰

Grupo I (Ambler Clase C)

Este grupo abarca las enzimas cefalosporinasas de tipo serina, las cuales se caracterizan por hidrolizar a los antibióticos tipo bencilpenicilina; estas enzimas no son inhibidas por ácido clavulánico, pero si por aztreonam (ATM).⁹¹ La producción de estas enzimas está regulada por la expresión de los genes *ampC*, en algunas enterobacterias esta expresión genética se encuentra disminuida pero con influencia de estímulos externos pueden llegar a ser inducibles.⁹² Recientemente se ha descrito la transferencia horizontal de los genes *ampC* desde *E. cloacae*, *C. freundii* y otros, hacia especies como *K. pneumoniae*, a través de plásmidos que acarrean los componentes para esta inducción.^{93,94,95,96}

Un estudio publicado en el 2017 hace referencia a que se encontraron en aislamientos de *K. pneumoniae* los siguientes genes CITM, EBCM, DHAM, FOXM catalogando a los aislamientos como productores de AmpC; adicionalmente, se reportó por primera vez la coexistencia de dos genes AmpC en aislamientos de *K. pneumoniae*.⁹⁷

Grupo II (Ambler clase A y D)

Es la categoría más grande con subgrupos, son penicilinasas que se agrupan de acuerdo con el porcentaje de hidrólisis a la carbenicilina, cefalosporinas, cloxacilina (oxacilina) o carbapenemes. Dentro de este grupo se colocan todas las enzimas serina con actividad penicilinasas e inhibidas por ácido clavulánico.⁹¹

Las enzimas de clase D se denominaron oxacilinasas (OXA) porque comúnmente hidrolizan las isoxazolilpenicilinas (oxacilinas, cloxacilinas y dicloxacilinas) mucho más rápido que las bencilpenicilinas, algunos subgrupos como OXA-23, OXA-48, OXA-51 y OXA-58 se reportan en *K. pneumoniae*. OXA-48 es una de las carbapenemasas de clase D más prevalentes.⁹⁸

Dentro de las BLEE de clase A, el grupo CTX-M ha adquirido una gran relevancia epidemiológica debido a su dispersión intra y extrahospitalaria y han sido aisladas en casi todas las enterobacterias, en particular en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter*.⁹⁹

Asimismo, incluidas en la clase A existen enzimas de espectro extendido derivadas de la SHV-1 (sulfhidrido variable), por ejemplo, la SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5, derivadas de diferentes mutaciones; en general estas enzimas han sido encontradas en muchas enterobacterias, sin embargo, son predominantes en *K. pneumoniae*.¹⁰⁰ Estas enzimas se encuentran distribuidas en tres subgrupos los cuales consideran las propiedades funcionales y/o características moleculares: en primer lugar se encuentra el subgrupo 2b el cual está conformado por enzimas que hidrolizan a las penicilinas y cefalosporinas de primera generación; sin embargo son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam; el siguiente es el 2br que está compuesto por enzimas de amplio espectro resistentes a ácido clavulánico; y finalmente el 2be, el cual comprende BLEE capaces de hidrolizar uno o más antibióticos betalactámicos tipo oximino como la cefotaxima, aztreonam y ceftazidima. Las modificaciones en el gen SHV-1 en su cadena de aminoácidos producen variantes genéticas que pueden llegar a tener de uno a seis sustituciones aminoacídicas las cuales son suficientes para transmitir el fenotipo de espectro extendido. Las sustituciones más frecuentes de aminoácidos se encuentran en las posiciones: leucina 35, ácido glutámico 240 y glicina 238 , mientras que otras sustituciones menos frecuentes pero críticas para el fenotipo de espectro extendido se producen en arginina 43, isoleucina 8, ácido glutámico 64, arginina 205, ácido aspártico 179 , glicina 156; estas sustituciones pueden llegar a cambiar conformacionalmente la molécula resultando en una ligera expansión del sitio activo, incrementando la afinidad por diferentes antibióticos betalactámicos (expansión del espectro de sustratos), pueden llegar a formar puentes electrostáticos con grupos carboxílicos de los sustituyentes oximinos de ceftazidima o aztreonam, generar el incremento de resistencia, entre otros.¹⁰¹

Las betalactamasas de espectro extendido tipo TEM son las de mayor prevalencia en aislamientos de *K. pneumoniae*, el término TEM proviene del nombre del paciente ateniense (Temoniera) del que se recuperó el primer aislamiento en 1963.¹⁰² Las variantes se generan debido a un cambio en la secuencia de aminoácidos de TEM-1 y TEM-2, dando lugar a un cambio profundo en su actividad enzimática, las variantes derivadas del gen *bla*TEM-1 presentan un sustrato y punto isoelectrico que varía de 5.2 a

6.5. La variante TEM-3 difiere del TEM-2 por dos sustituciones de aminoácidos, TEM-4 difiere de 4 aminoácidos del TEM -1 y TEM -5 difiere de 3 aminoácidos del TEM-1. Se conocen 217 variantes de TEM.^{11, 103}

Existen carbapenemasas cromosómicas como la NMC-A, enzimas SME, IMI-1, SHV-38 y SFC-1 y plasmídicas, dentro de las cuales se encuentran las enzimas GES, enzimas KPC e IMI-2. Las KPC son carbapenemasas de clase A producidas principalmente por *K. pneumoniae*.¹⁰⁴ Estructuralmente consiste en dos subdominios, α - helicoidal y el otro posee una hoja β de cinco hebras que se encuentra rodeada por α - hélices, se postula que los aminoácidos arginina en posición 220 e histidina en 274 afectan la unión del sustrato, ya sea electrostática o indirectamente a través del reposicionamiento del aminoácido treonina en posición 237, los cambios sutiles pero cruciales en la topología del sitio activo resulta en un sitio activo más amplio en comparación con TEM-1 y SHV-1.¹⁰⁵ Se han registrado 24 variantes del gen bla_{KPC}, los cuales se diferencian de uno a tres aminoácidos, las variantes KPC-1 y KPC-2 representan a una sola enzima debido a que poseen 100% de similitud, las variantes más comunes y aisladas frecuentemente son la KPC-2 y la KPC-3, causantes de brotes epidémicos.¹⁷

Grupo III (Ambler clase B)

En esta clase se ubican la mayoría de las betalactamasas cuya característica principal radica que en presencia de EDTA disminuyen su actividad, pero no son afectadas por el ácido clavulánico, están compuestas por metaloenzimas que pueden ser de codificación cromosómica o plasmídica.⁹¹

Las carbapenemasas de clase B se identificaron principalmente en enterobacterias e incluyen VIM, IMPs y el grupo de NDM (Nueva Delhi Metalobetalactamasa) emergente. Además de las carbapenemasas tipo NDM, los grupos IMP y VIM también se han detectado en todo el mundo en *K. pneumoniae*, pero no se han encontrado otras carbapenemasas, como GIM-1, KHM-1 y SPM-1, en *K. pneumoniae*.¹⁰⁶ Al menos un átomo de zinc está presente en el sitio activo de todas las metalobetalactamasas, lo cual facilita la hidrólisis del anillo bicíclico de los antibióticos betalactámicos pero

muestran sensibilidad a los quelantes de iones metálicos; la enzima tipo NDM puede hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes pero carecen de la capacidad de hidrolizar aztreonam. Se han informado 21 variantes de desde NDM-1 a NDM-21, en NDM-2 se observó un cambio de aminoácidos en la posición 82 de cisteína por glicina, por otro lado, el aminoácido prolina fue sustituido por alanina en la posición 28 resultado de esta mutación es que la variante NDM-2 no puede dar lugar a la transconjugación. La variante NDM-3 en la cual la asparagina sustituye a aspartato en la posición 95 demostró actividades enzimáticas similares contra betalactámicos como las de NDM-1, la mayoría de estas mutaciones ocurren en sitios distantes del sitio activo, y las funciones que confieren no son muy notorias, de NDM-1 a NDM-8 se observan solo pequeñas diferencias en los valores de k_{cat} / K_m (≤ 5 veces) para un panel de diversos medicamentos β -lactámicos. Sin embargo, si hay un aumento considerable en la termoestabilidad de muchas de las variantes, lo que sugiere que el impacto funcional de las mutaciones de NDM puede conferir estabilidad.^{107, 108}

4.2.3.3 Impermeabilidad bacteriana

La membrana externa (OM) posee múltiples funciones como la regulación del transporte pasivo de solutos extracelulares al interior de la célula, expulsión de sustancias tóxicas del espacio intracelular y la interacción con el ambiente; la afluencia es controlada por unas proteínas ubicadas en la membrana externa (OMPs), también conocidas como porinas, las cuales se encuentran en grandes cantidades en la membrana externa y permiten el transporte de moléculas hidrofílicas y antibióticos clínicamente significativos (betalactámicos y fluoroquinolonas) a través de la bicapa lipídica.^{109, 110}

La pérdida de estas porinas es uno de los factores que pueden coadyuvar a la resistencia a antibióticos en las bacterias tipo BLEE; *K. pneumoniae* produce dos porinas principales no específicas OmpK35 y la OmpK36, muchos aislados clínicos de *K. pneumoniae* que carecen de BLEE expresan ambas porinas no específicas OmpK35 y la OmpK36, mientras que aquellas *K. pneumoniae* que expresan BLEE poseen solamente OmpK36 o carecen de las dos porinas.^{111, 112}

La baja expresión y la ausencia de estas dos principales porinas (OmpK35, OmpK36), juntamente con la producción de betalactamasas han sido implicadas en la resistencia a carbapenemes; es así como la deficiencia de la porina denominada LamB (porina transportadora de maltosa y maltodextrina) sobre expresada en la deficiencia de OmpK36, disminuye débilmente la susceptibilidad a cefepime, piperacilina-tazobactam, cefotaxima, imipenem, meropenem y ertapenem.¹¹³

Se ha evidenciado que en las porinas de la membrana externa (OMPs) de cepas de *Kl. pneumoniae* sensibles a carbapenemes, se encuentra una porina denominada PhoE (porina reguladora del fosfato), la pérdida de la expresión de esta porina también se encuentra ligada a la resistencia a carbapenemes.¹¹⁴

4.2.3.4 Expulsión del antibiótico

Las bombas de eflujo (EPs) están involucradas en la resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos tanto en bacterias gram negativas como en gram positivas.¹¹⁵ Existen dos mecanismos por los cuales se expulsa los componentes tóxicos para la bacteria; la primera es la sobreexpresión de las bombas de eflujo para sobrellevar el incremento del antibiótico que se encuentra dentro de la célula y el segundo son las mutaciones que sufren las EPs para expulsar el antibiótico de manera más eficiente.¹¹⁶ Las bombas de eflujo relacionadas a la multidrogo resistencia se dividen en cuatro familias: resistencia-nodulación-división (RND), superfamilia de facilitadores principales (MFS), resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR) y familia de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATE).¹¹⁷

El complejo AcrAB-TolC (AcrAB perteneciente a la familia RND y TolC proteína de OM) en *Klebsiella* es un sistema de eflujo clínicamente relevante, que extruye compuestos de una manera dependiente de la energía (antiportadores de protones). Los sustratos de AcrAB pueden tener una estructura muy diversa (con cargas negativas o positivas) y el único requisito para el transporte exitoso del fármaco es la presencia de un dominio hidrofóbico que se inserte en la bicapa de fosfolípidos. La sobreexpresión del complejo AcrAB-TolC se ha asociado a la resistencia de betalactámicos en aislados clínicos de *K. pneumoniae*.¹¹⁸

4.2.3.5 Formación de biofilms

K. pneumoniae crece adherida a las superficies de dispositivos y tejidos infectados produciendo biofilms dentro de los cuales la bacteria persiste por largos periodos de tiempo a pesar de la terapia antimicrobiana y la presencia de un sistema inmune. Los biofilms bacterianos también presentan un riesgo de diseminación entre pacientes.¹¹⁹ La formación de estas biopelículas se ha visto relacionada con las fimbrias tipo 1 y 3 de aislados clínicos de *K. pneumoniae* debido a que proporcionan una alta capacidad adherente.¹²⁰

Los mecanismos en los cuales está basada esta respuesta adaptativa incluyen penetración restringida, enzimas que destruyen los antimicrobianos, crecimiento limitado o anaeróbico en la base de los biofilms, “quórum sensing” específicos regulados por mecanismos de resistencia individuales para cada antibiótico, presencia de células persistentes y respuestas generales al estrés.⁵¹

4.2.4 Elementos genéticos móviles de *Klebsiella pneumoniae*

Los elementos genéticos móviles generan resistencia bacteriana, los de mayor frecuencia en aislados clínicos de *K. pneumoniae* son los integrones de clase I.¹²¹

4.2.4.1 Integrones

Son elementos genéticos que capturan y diseminan genes de resistencia.¹²² Los integrones actúan como un casete de expresión para los genes que se inserten.¹²³ Los integrones clase I han sido considerados como elementos importantes en la diseminación de genes que confieren resistencia a los betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas en *K. pneumoniae*. Los integrones pertenecientes a la clase I están constituidos por dos regiones de ADN ubicadas en los extremos, en la región variable se insertan los diferentes casetes génicos, en estudios de secuenciación realizados son en su mayoría genes que codifican resistencia a los antimicrobianos.¹²² Los integrones de clase I son los más estudiados y han sido identificados sobre todo en aislamientos clínicos.¹²⁴

4.2.4.2 Transposones

En el 2008 en Colombia se realizó un estudio de caracterización de aislamientos de *K. pneumoniae* donde se encontró el transposón Tn4401, este elemento genético se sugirió que está involucrado en la movilización del gen bla_{KPC} a plásmidos.¹²⁵

4.2.4.3 Plásmidos

Los plásmidos que tienen mayor frecuencia encontrados en el género Enterobacteriaceae son las del grupo de incompatibilidad IncF, este tipo de plásmidos y los IncA/C, están conformados aproximadamente por 15 proteínas y de una región denominada oriT.¹²⁶

En el 2012 se realizó un estudio con aislamientos de cepas de *K. pneumoniae* con los cuales se determinó secuencias de inserción IS CR1, esto se obtuvo a través de la técnica de PCR y secuenciación directa. Este elemento genético se asocia con los integrones de clase I y facilita la diseminación del gen bla_{CTX-M}.¹²⁵

El gen bla_{SHV} presentes en *K. pneumoniae* se movilizan desde el cromosoma hacia los plásmidos de tipo conjugativos por medio del elemento genético IS26, facilitando su rápida diseminación del gen bla_{SHV}.¹²⁶ El gen bla_{NDM} en *K. pneumoniae* se disemina a través de plásmidos IncA/C2.^{17, 126} El gen bla_{KPC} en *K. pneumoniae* se disemina a través de plásmidos de tipo IncF II.¹¹⁸

V. METODOLOGÍA

5.1 Tipo y diseño general de estudio

El presente trabajo de investigación es un estudio de tipo observacional, descriptivo.

5.2 Materiales

5.2.1 Material Biológico

50 cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de muestras de hisopado rectal y sistémicas (Orina, sangre, tejido, secreción bronquial, y secreción de heridas) de pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen recolectadas por el Laboratorio de Microbiología del hospital en el periodo de abril-mayo del 2018.

5.2.2 Cepas control

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705
- *Klebsiella pneumoniae* BAA2146

5.2.3 Materiales y equipos de laboratorio

Ver Anexo N°1

5.3 Procedimiento

5.3.1 Recolección y conservación de cepas clínicas

Se recolectaron 50 cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de muestras biológicas de pacientes hospitalizados (sistémicas y rectales) en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en los meses de abril y mayo 2018.

Las cepas fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología del hospital donde permanecían conservadas en crioviales con Agar TSA y congeladas a -20°C, se recuperaron y cultivaron en crioviales con glicerol al 20% y TSB, luego se conservaron a -20°C para su posterior análisis en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

5.3.2 Susceptibilidad antimicrobiana

Se tomaron los datos de susceptibilidad antimicrobiana de los reportes realizados por el Laboratorio de Microbiología por cada cepa obtenida.

5.3.3 Activación de las cepas

Las cepas clínicas conservadas de *Klebsiella pneumoniae* se activaron cultivando 50 µL del caldo TSB/glicerol 20% en 5 mL de caldo tripticasa soya e incubándolas a 37°C por 24 horas.

5.3.4 Identificación bioquímica

Se confirmó la identificación de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* evidenciando sus características en los siguientes medios: Agar Mac Conkey, Agar TSI, Agar Citrato de Simmons, Agar LIA (Agar Lisina Hierro), Medio MIO (medio de movilidad indol ornitina).

5.3.5 Control de Calidad

Se asegura la calidad de los métodos empleados mediante bacterias ATCC. (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705, *Klebsiella pneumoniae* BAA 2146).

5.3.6 Confirmación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido

El descarte de betalactamasas de espectro extendido se realizó en las cepas cuya susceptibilidad antimicrobiana mostró sensibilidad a carbapenemes y resistencia a las cefalosporinas en el perfil de susceptibilidad; se utilizaron dos métodos:

a) Método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas.^{37, 127}

Se realizó la prueba de sinergia de doble disco basada en el Método de Jarlier para la detección de BLEE.

Se procedió a cultivar las cepas clínicas y controles de *Klebsiella pneumoniae* en Agar Tripticasa Soya (TSA) por el método de aislamiento incubándolas a 37°C por 24 horas, cumplido el tiempo de incubación se procedió a preparar una suspensión 0.5 Mc Farland de cada muestra en estudio mediante comparación con un patrón escala 0.5 Mc Farland; se cultivaron las suspensiones realizadas mediante la técnica de hisopado en placas de agar Mueller-Hinton, luego de 15 minutos se colocaron en cada placa un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg) en el centro de la placa y a los costados equidistantemente un disco de ceftazidima (30 µg) y de cefotaxima (30 µg) (25mm de distancia).

Se confirmaba la presencia de BLEE al evidenciar una sinergia entre el disco de ácido clavulánico y los discos de ceftazidima y cefotaxima aumentando más de 5 mm el diámetro del halo de inhibición.

b) Método de disco combinado: Test confirmatorio BLEE - CLSI (método americano).³⁸

Se procedió a preparar las suspensiones 0.5 Mc Farland de cada cepa en estudio para luego inocular por el método de hisopado en placas de agar Mueller-Hinton, en cada placa se colocaron discos de susceptibilidad antimicrobiana siguiendo las recomendaciones del CLSI; los discos empleados fueron ceftazidima (30 µg), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 µg), cefotaxima (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10 µg).

Una diferencia en los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ solos o CXT-CLA y CTX mayor o igual a 5 mm, fue interpretada como resultado positivo.

5.3.7. Confirmación fenotípica de carbapenemasas

El descarte de presencia de carbapenemasas en las cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* cuyos resultados en el perfil de susceptibilidad manifestaron resistencia a cefalosporinas y carbapenemes se realizó utilizando el siguiente método:

a) Método modificado de inactivación de carbapenemasas (MICm)¹²⁸

Se procedió a incubar 1 µL de la bacteria a estudiar de un cultivo fresco transfiriéndolos a un tubo que contenía 2 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) mezclando la suspensión en Vortex, seguidamente se procedió a insertar un disco estándar de meropenem de 10 µg a la suspensión incubándola por 4 horas a 37°C, antes de completar el ciclo de 4 horas de incubación, se preparó una suspensión 0.5 McFarland de *E. coli* ATCC 25922 y se inoculó en una placa de agar Mueller Hinton (MHA) por el método de hisopado; con una asa microbiológica estéril, se removió el disco de la suspensión en TSB, teniendo precaución en remover el exceso de líquido del disco, el disco de meropenem se colocó inmediatamente en la placa del MHA que había sido inoculada con la *E. coli* ATCC 25922 (método de hisopado) y la placa se incubó a 37°C por 24h, luego se midió el diámetro del halo de inhibición alrededor del disco de meropenem. Las cepas clínicas *Klebsiella pneumoniae* que presentaron enzimas carbapenemasas, degradaron el meropenem presente en el disco estándar permitiendo que la cepa *E. coli* ATCC 25922 (sensible a carbapenemes) creciera alrededor del disco carbapenem.

La interpretación de resultados fue de la siguiente manera:

- Carbapenemasa positiva: Halo 6-15 mm o presencia de colonias dentro de un halo de 16-18 mm.
- Carbapenemasa negativa: Halo ≥ 19 mm.
- Indeterminado: Halo 16-18 mm (no se puede confirmar si el aislamiento es o no es productor de carbapenemasa)

Para el descarte entre enzimas metalobetalactamasas y enzimas carbapenemasas tipo A, se utilizaron los dos métodos siguientes:

b) Sinergia a doble disco con ácido fenilborónico (APB)^{43, 129}

Se utilizó este método con el disco de sensibilidad ácido 3-aminofenilborónico 300 µg (APB) para determinar si las carbapenemasas presentes en las cepas clínicas en estudio se tratan de enzimas carbapenemasas clase A (clasificación de Ambler) con centro activo tipo serina como las enzimas tipo KPC, el disco de APB actúa como inhibidor de este tipo de carbapenemasas y puede hacer sinergia con los discos de carbapenem en este tipo de enzimas; para ello se hisoparon placas de agar Mueller-Hinton con una suspensión 0,5 Mc Farland del aislamiento en estudio y se colocaron por cada placa un disco de APB a una distancia media frente a los discos de cada carbapenem, Imipenem 10 µg (IMP) y Meropenem 10 µg (MEM), incubando las placas por 24 horas en estufa a 37°C.

El agrandamiento del halo de inhibición del carbapenem hacia el lado del disco con el inhibidor se interpreta como un resultado positivo (sinergia).

c) Sinergia a doble disco con ácido etilendiaminotetraacético asociado a mercaptoacetato de sodio (EDTA-SMA)^{130,131}

Se utilizó el método de sinergia a doble disco con EDTA-SMA para determinar si las carbapenemasas presentes en las cepas clínicas en estudio se trataban de las enzimas carbapenemasas clase B como el tipo NDM (clasificación de Ambler), el disco de EDTA-SMA actúa como inhibidor de este tipo de carbapenemasas y puede hacer sinergia con los discos de carbapenem en este tipo de enzimas, para ello se hisoparon placas de agar Mueller-Hinton con una suspensión 0,5 Mc Farland del aislamiento en estudio y se colocaron por cada placa un disco que contiene el inhibidor (EDTA 750 µg -SMA 2 mg) rodeado por un disco de imipenem (10µg) y otro de meropenem (10µg) ubicados a una distancia de 15 mm entre centro y centro.

El agrandamiento del halo de inhibición del carbapenem hacia el lado del disco con el inhibidor se interpreta como un resultado positivo (sinergia).

5.3.8 Extracción de ADN

Se empleó el método de extracción por calor, el cual consistió en cultivar la cepas en estudio por 24 horas a 37°C, cumplido el tiempo se procedió a inocular de 2 a 3 colonias en un criovial que contenía 200 µL del buffer TE 1X (Tris-HCl-EDTA pH 7.5), la suspensión se mezcló en vortex y se añadió 20 µL de proteinasa K luego se llevó a incubar en el equipo JP SELECTA por 25 minutos a 65°C, luego se incubó en agua a 95°C por 10 minutos. Finalmente se centrifugaron los crioviales a 5600 RPM (revoluciones por minuto) por 10 minutos.^{37, 132, 133, 134}

5.3.9 Amplificación

a) Amplificación de los genes bla_{TEM} y bla_{SHV} que codifican betalactamasas de espectro extendido

Tabla 5. Secuencia de cebadores de los genes bla_{TEM} y bla_{SHV} y peso del amplicón.

Gen	Secuencia de cebadores (5' → '3)	Peso del amplicón (bp)	Referencia
bla _{TEM}	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC	1078 bp	(37,137)
bla _{SHV}	TGG TTA TGC GTT ATA TTC GCC GGT TAG CGT TGC CAG TGC T	870 bp	(37,135, 136)

Las condiciones para la amplificación en PCR del gen bla_{SHV} fueron las siguientes: (Tabla 6).¹³⁶

Tabla 6. Formulación para amplificación en PCR del gen bla_{SHV}

Reactivo	Volumen
Buffer de PCR 10X	2.5 µL
MgCl 100mM	0.05 µL
Primer S1 10uM	0.2 µL
Primer S2 10uM	0.2 µL
dNTPmix 10mM	0.5 µL
Taq polimerasa 250U/50ul	0.2 µL
Muestra fuente de ADN	3 µL
Agua bidestilada	18.35 µL
Volumen total	25 µL

*MgCl: Cloruro de Magnesio, dNTPmix: mezcla de reacción de los desoxirribonucleótidos trifosfatos.

Adaptado de Kim et.al¹³⁶

Las condiciones para la amplificación en PCR del gen bla_{TEM} fueron las siguientes: (Tabla 7).¹³⁷

Tabla 7. Formulación para amplificación en PCR del gen bla_{TEM}

Reactivo	Volumen
Buffer de PCR 10X	2,5 µL
MgCl 100mM	0.05 µL
Primer T1 10uM	0.2 µL
Primer T2 10uM	0.2 µL
dNTPmix 10mM	0.5 µL
Taq polimerasa 250U/50ul	0.3 µL
Muestra fuente de ADN	3 µL
Agua bidestilada	18.25 µL
Volumen total	25 µL

*MgCl: Cloruro de Magnesio, dNTPmix: mezcla de reacción de los desoxirribonucleótidos trifosfatos.

Adaptado de Jain et.al¹³⁷

Los parámetros de la amplificación de los genes bla_{TEM} y bla_{SHV} se encuentran resumidos en la Tabla 8 y se realizaron utilizando un termociclador marca eppendorf.^{37,}

136, 137

Tabla 8. Parámetros para la amplificación de los genes bla_{TEM} y bla_{SHV}.

Parámetros	bla _{TEM}	bla _{SHV}
Desnaturalización inicial	95 °C x 5min	94°C x 5min
Nº de ciclos	35	35
Ciclo:		
Desnaturalización	94°C x 30seg	94°C x 30seg
Alineamiento	54°C x 90seg	58°C x 1min
Extensión	72°C x 1min	72°C x 1min
Extensión final	72°C x 5min	72°C x 10min

*°C: grados centígrados, min: minutos, seg: segundos.

Adaptado de Morales et.al³⁷

b) Amplificación de los genes bla_{KPC} y bla_{NDM} que codifican carbapenemasas

Tabla 9. Secuencia de cebadores de los genes bla_{KPC} y bla_{NDM} y peso del amplicón.

Gen	Secuencia de cebadores (5' → 3')	Peso del amplicón (bp)	Referencia
bla _{KPC}	TGT TGC TGA AGG AGT TGG GC ACG ACG GCA TAG TCA TTT GC	340 bp	(132)
bla _{NDM}	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC GGC GTA GTG CTC AGT GTC	512 bp	(48, 138, 139)

Las condiciones para la amplificación en PCR del gen bla_{KPC} fueron las siguientes: (Tabla 10).¹³²

Tabla 10. Formulación para amplificación en PCR del gen bla_{KPC}

Reactivo	Volumen
Buffer de PCR 10X	5 µL
MgCl (100Mm)	0.05 µL
Primer K1 10uM	0.05 µL
Primer K2 10uM	0.05 µL
dNTPmix 10mM	0.625 µL
Taq polimerasa 250U/50ul	0.2 µL
Muestra fuente de ADN	3 µL
Agua bidestilada	16.025 µL
Volumen total	25 µL

*MgCl: Cloruro de Magnesio, dNTPmix: mezcla de reacción de los desoxirribonucleótidos trifosfatos.

Adaptado de Mlynarcik et.al.¹³²

Las condiciones para la amplificación en PCR del gen bla_{NDM} fue la siguiente: (Tabla 11).^{48, 138, 139}

Tabla 11. Formulación para amplificación en PCR del gen bla_{NDM}

Reactivo	Volumen
Buffer de PCR 10X	2.5 µL
MgCl 100mM	0.05 µL
Primer K1 10uM	0.5 µL
Primer K2 10uM	0.5 µL
dNTPmix 10mM	0.5 µL
Taq polimerasa 250U/50ul	0.15 µL
Muestra fuente de ADN	3 µL
Agua bidestilada	17.8 µL
Volumen total	25 µL

*MgCl: Cloruro de Magnesio, dNTPmix: mezcla de reacción de los desoxirribonucleótidos trifosfatos.

Adaptado de Pasteran et.al¹³⁸

Los parámetros de la amplificación de los genes bla_{KPC} y bla_{NDM} se encuentran resumidos en la Tabla 12 y se realizaron utilizando el termociclador marca Eppendorf.

48, 132, 138, 139

Tabla 12. Parámetros para la amplificación de los genes bla_{KPC} y bla_{NDM}.

Parámetros	bla _{KPC}	bla _{NDM}
Desnaturalización inicial	95 °C x 5min	94°C x 5min
Nº de ciclos	35	35
Ciclo:		
Desnaturalización	95°C x 1min	94°C x 30seg
Alineamiento	56°C x 1min	50°C x 30seg
Extensión	72°C x 1min	72°C x 1min
Extensión final	72°C x 5min	72°C x 10min

*°C: grados centígrados, min: minutos, seg: segundos.

Adaptado de Mlynarcik et.al¹³² y Pasteran et.al¹³⁸

3.2.10 Electroforesis en gel Agarosa

Se preparó un gel de agarosa 1.5% disuelto en buffer TBE 0.5X, se corrió la electroforesis a 80 voltios por 1 hora para la amplificación de los genes bla_{SHV} y bla_{TEM}, para el gen bla_{NDM} se corrió la electroforesis a 95 voltios por 45 minutos y para el gen bla_{KPC} a 100 voltios por una hora.^{37, 132, 138}

Las bandas se visualizaron con un transiluminador para la visualización de los fragmentos de ADN.

VI. RESULTADOS

6.1 Susceptibilidad Antimicrobiana y características epidemiológicas

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana realizado por el Laboratorio de Microbiología del HNGAI mostró que el 98% (49/50) de las cepas en estudio eran resistentes a meropenem, imipenem (posible carbapenemasas) y 2% (01/50) mostró sensibilidad a meropenem e imipenem, pero resistencia a ertapenem y cefalosporinas de tercera generación (posible BLEE). (Figura 4).

En cuanto a las características clínico-epidemiológicas, por procedencia de servicios de las 50 cepas de *Klebsiella pneumoniae* 70% (35/50) proceden de servicios de hospitalización y 30% (15/50) proceden de servicios de emergencia; por procedencia de tipo de muestra 48% (24/50) provienen de muestras de hisopado rectal y 52% (26/50) están divididas en muestras de origen sistémico. (Figura 5 y Figura 6).

6.2 Identificación bioquímica

Mediante las pruebas en los medios Mac Conkey, TSI, Citrato de Simmons, LIA, MIO se confirmó que las 50 cepas clínicas en estudio pertenecían a la especie *Klebsiella pneumoniae*. (Figura 8)

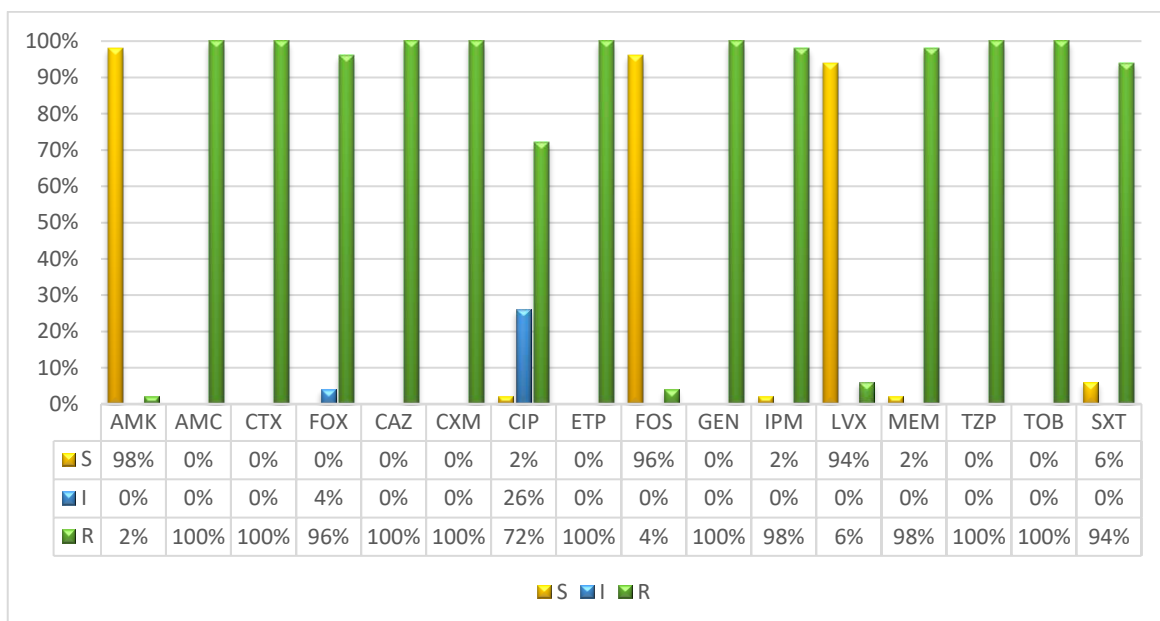


Figura 4. Resultados del perfil de susceptibilidad de las cepas clínicas en estudio de *Klebsiella pneumoniae*

El 98% (49/50) de las cepas en estudio resultó sensible y 2% (1/50) resistente a AMK (amikacina); 96% (48/50) resistente y 4% (2/50) con resistencia intermedia a FOX (cefotixina); 72% (36/50) resistente, 26% (18/50) con resistencia intermedia y 2% (1/50) sensible a CIP (ciprofloxacina); 96% (48/50) sensible y 4% (2/50) resistente a FOS (fosfomicina); 2% (1/50) sensible y 98% (49/50) resistente a IPM (imipenem), 94% (47/50) sensible y 6% (3/50) resistente a LVX (levofloxacino), 2% (1/50) sensible y 98% (49/50) resistente a MEM (meropenem), 6% (3/50) sensible y 94% (47/50) resistente a SXT (sulfametoxazol + trimetoprima); 100% (50/50) resistente a AMC (amoxicilina + ácido clavulánico), CTX (ceftriaxona), CAZ (ceftazidima), CXM (cefuroxima), ETP (ertapenem), GEN (gentamicina), TZP (piperacilina + tazobactam), TOB (tobramicina).

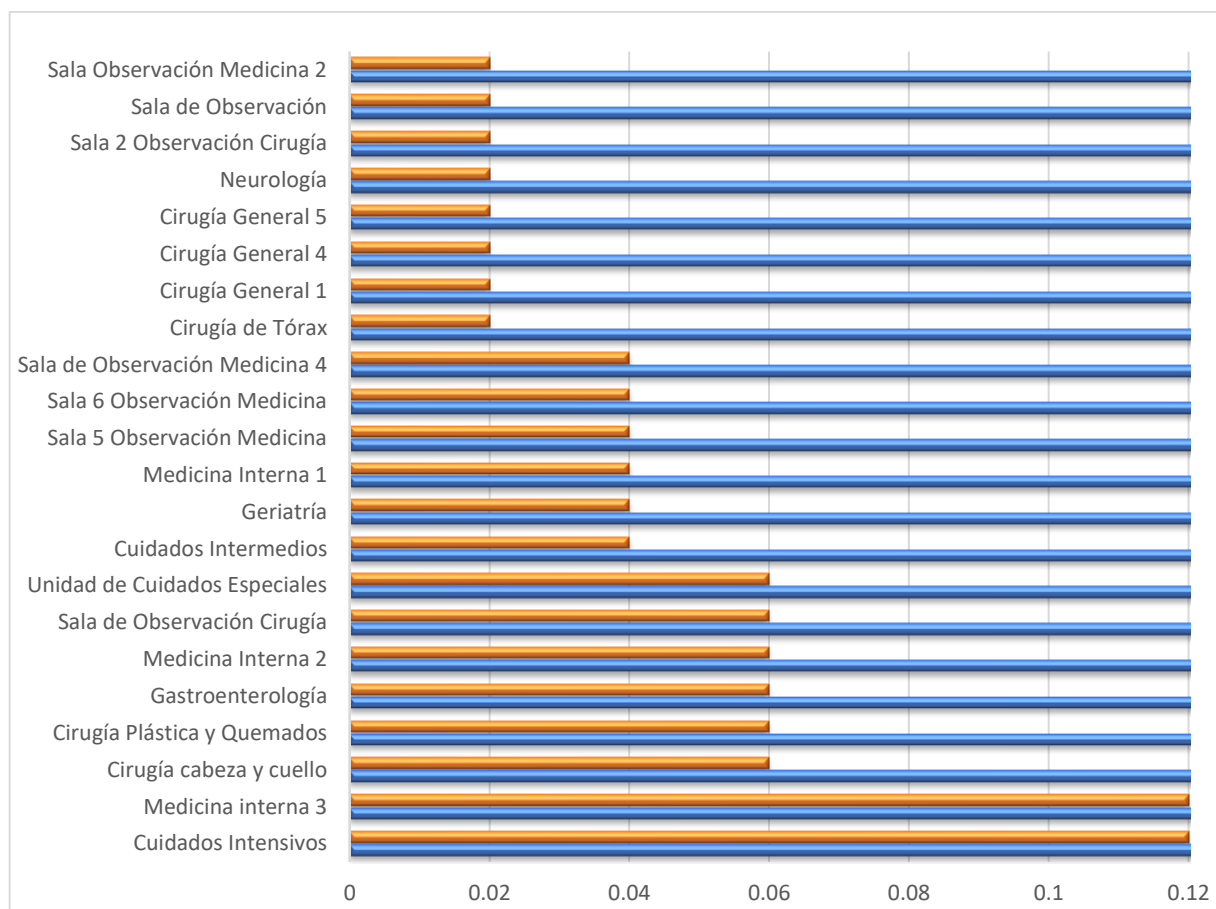


Figura 5. Distribución de cepas clínicas en estudio de *Klebsiella pneumoniae* por procedencia de servicio

Los servicios donde hubo mayor distribución de cepas clínicas estudiadas de *Klebsiella pneumoniae* fueron los servicios de Cuidados Intensivos y Medicina Interna 3 cada uno con 12% (6/50); los servicios de Unidad de Cuidados Especiales, Sala de Observación Cirugía, Medicina Interna 2, Gastroenterología, Cirugía Plástica y Quemados, Cirugía cabeza y cuello cada uno con 6% (3/50); Sala de Observación Medicina 4, Sala 6 Observación Medicina, Sala 5 Observación Medicina, Medicina Interna 1, Geriatría, Cuidados Intermedios cada uno con 4% (2/50); Sala de Observación Medicina 2, Sala de Observación, Sala 2 Observación Cirugía, Neurología, Cirugía General 5, Cirugía General 4, Cirugía General 1 y Cirugía de Tórax cada uno con 2% (1/50).

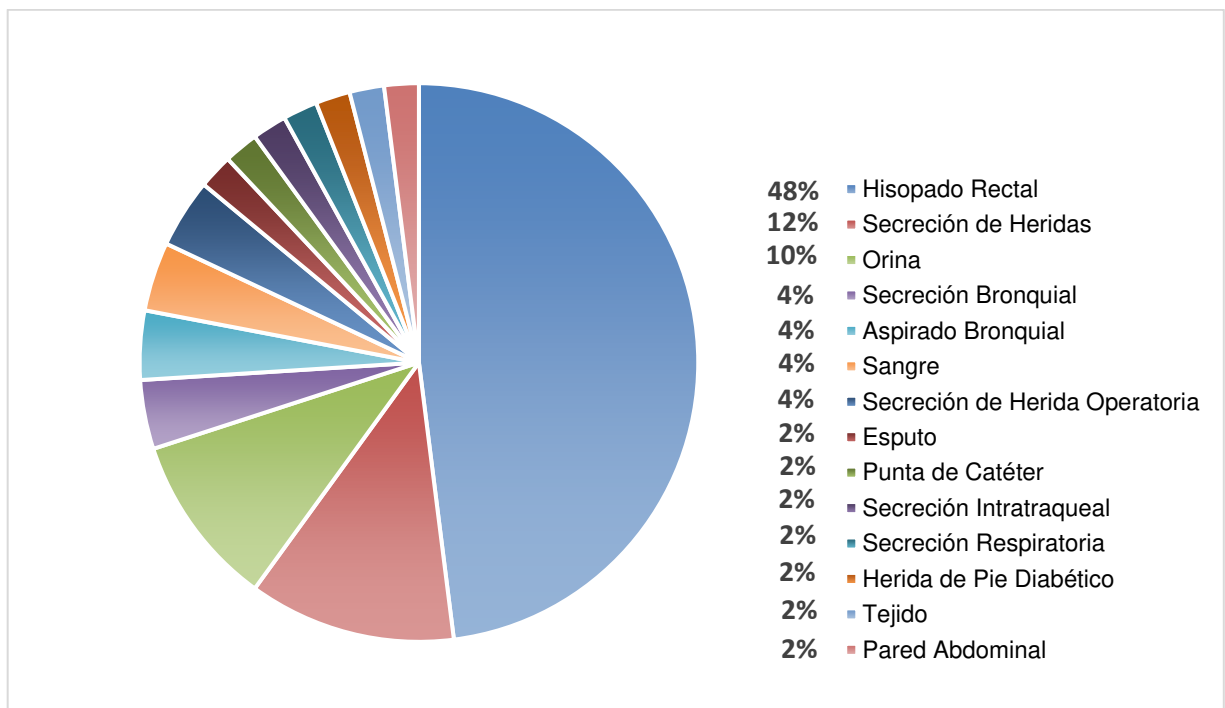


Figura 6. Distribución de las cepas clínicas en estudio de *Klebsiella pneumoniae* por procedencia de tipo de muestra

De las 50 cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae*, 48% (24/50) provienen de muestras de hisopado rectal y 52% (26/50) están divididas en muestras de origen sistémico como sigue: 12% (6/50) provienen de secreción de herida, 10% (5/50) de Orina, 4% (2/50) de secreción bronquial, aspirado bronquial, sangre, secreción de herida operatoria por cada tipo; 2% (1/50) de esputo, punta de catéter, secreción intratraqueal, secreción respiratoria, herida de pie diabético, tejido, pared abdominal por cada tipo.

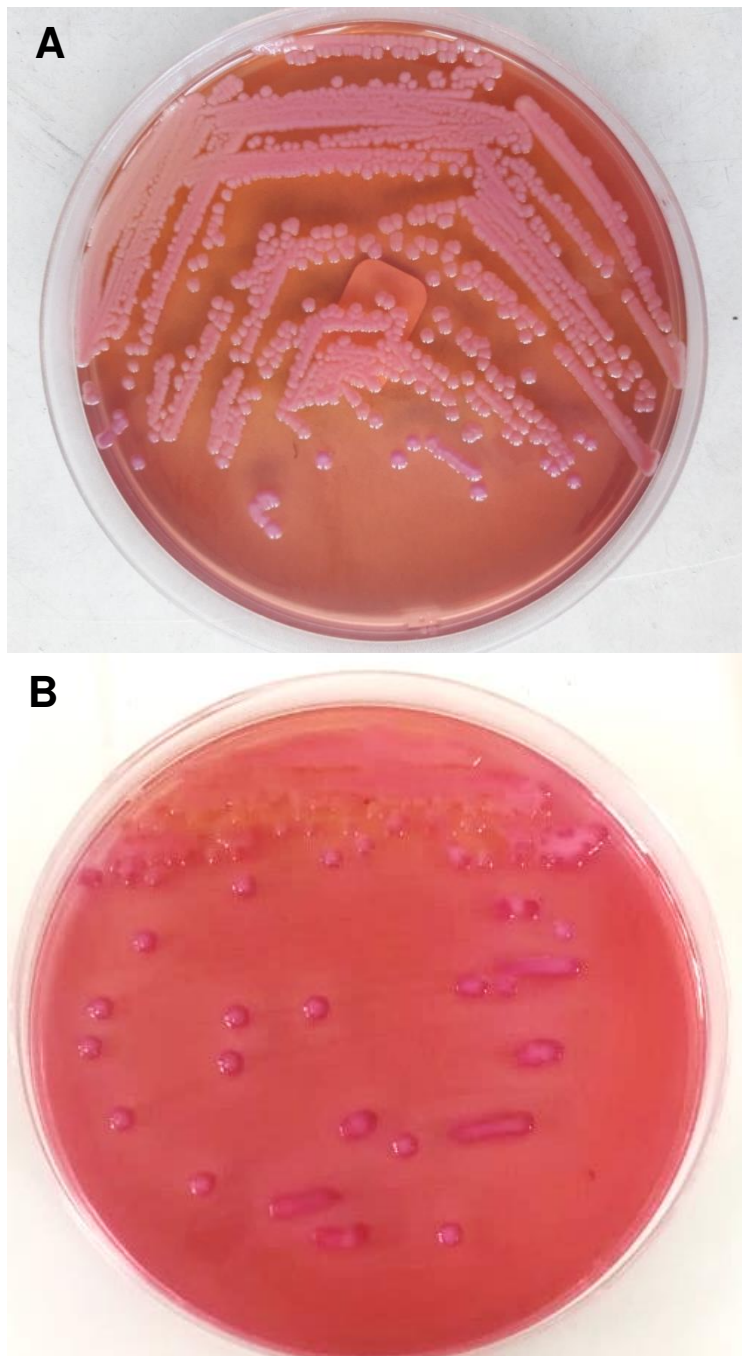


Figura 7. Identificación de cepas clínicas en Agar Mac Conkey
A: Cepa clínica en estudio de *Klebsiella pneumoniae*, B: Cepa control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. En A y B se observan colonias tamaño mediano, mucosas, con borde regular, forma circular y aspecto liso y brillante.

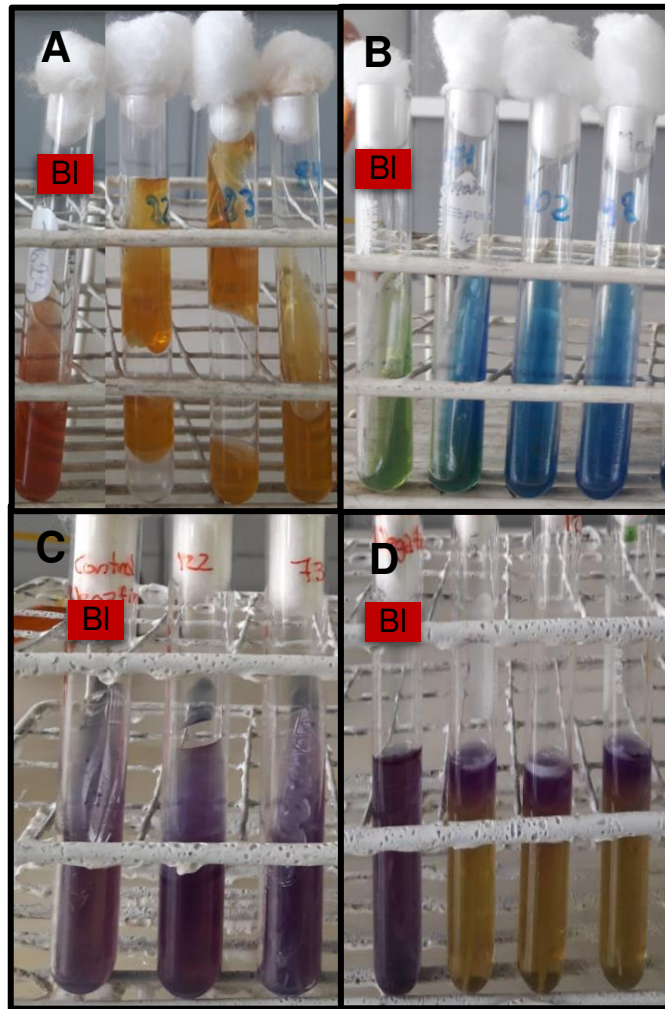


Figura 8. Identificación bioquímica en medios TSI, citrato, LIA, MIO Cepas clínicas en estudio de *Klebsiella pneumoniae* cultivadas en medio A: Medio TSI (agar triple azúcar hierro), cepas positivas para producción de gas con fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa, B: Agar Citrato de Simmons, cepas positivas para fermentación de citrato, C: Medio LIA (Agar Lisina Hierro), cepas positivas para descarboxilación de lisina y D: Medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina), se observa crecimiento bacteriano en la línea de siembra, cepas negativas para descarboxilación de ornitina. Bl: Blanco.

6.3 Confirmación fenotípica

6.3.1 Confirmación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido

La cepa sensible a meropenem e imipenem, pero resistente a cefalosporinas y ertapenem en el perfil de susceptibilidad obtenido del Servicio de Microbiología del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen dio positivo en los dos métodos fenotípicos para identificación de BLEE, la cepa control positivo fue *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Figura 9).

6.3.2. Confirmación fenotípica de carbapenemasas

Las 49 cepas resistentes a carbapenem en el perfil de susceptibilidad dieron positivo para producción de carbapenemasas mediante el Método modificado de inactivación de carbapenemasas (MICm), la cepa control positivo fue *K. pneumoniae* BAA 1705 (Figura 10).

Mediante el método de sinergia a doble disco con el inhibidor ácido fenilborónico (APB) se evidenció una cepa productora de carbapenemasas tipo A en la Clasificación de Ambler (posible KPC), la cepa control positivo fue *K. pneumoniae* BAA 1705 (Figura 11).

Mediante el método de sinergia a doble disco con el inhibidor etilendiaminotetraacético asociado a mercaptoacetato de sodio (MBL) se evidenciaron 48 cepas productoras de carbapenemasas tipo B en la Clasificación de Ambler, también llamadas metalobetalactamasas (posible NDM), la cepa control positivo fue *K. pneumoniae* BAA 2146 (Figura 12).

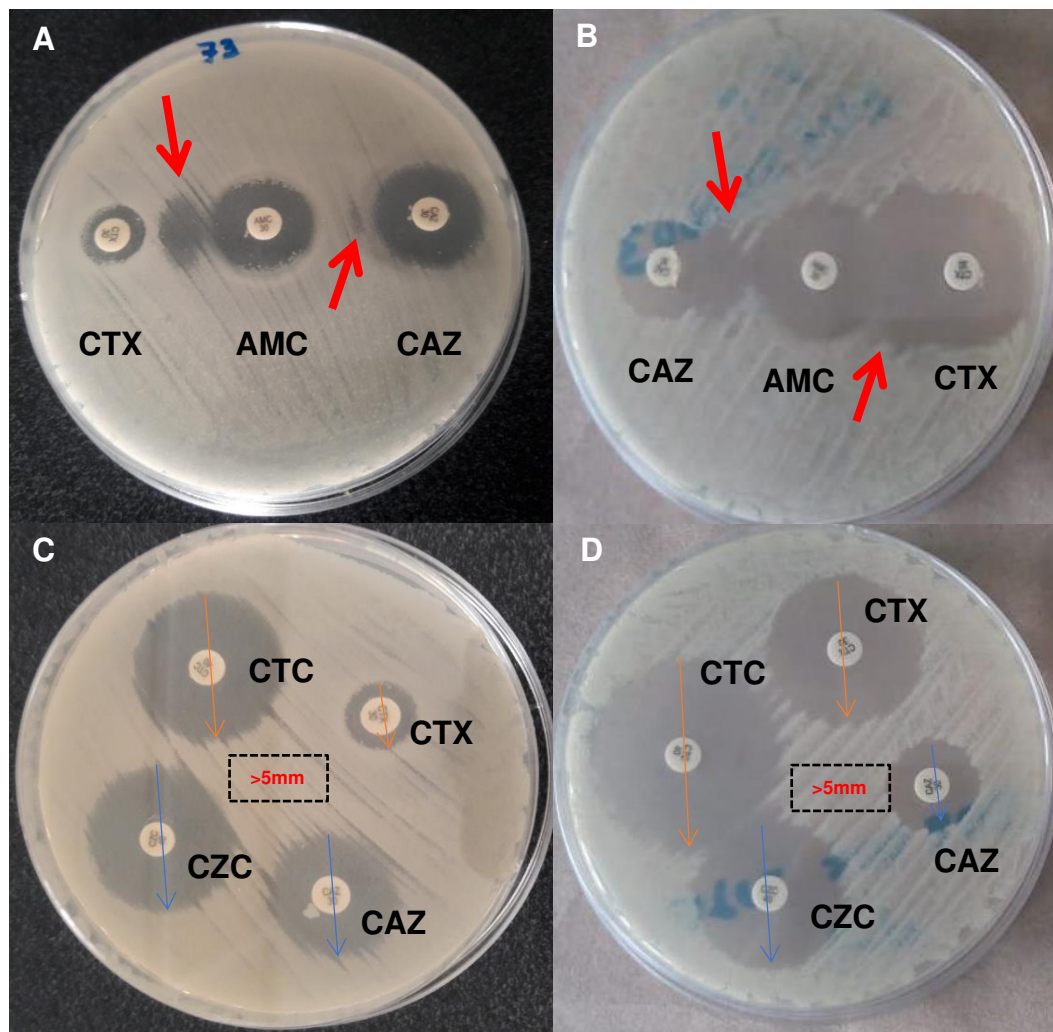


Figura 9. Confirmación fenotípica de BLEE

A: Método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas, se evidencia sinergia entre los discos de CTX, CAZ con el disco AMC, para una cepa clínica en estudio. B: Método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas, se evidencia sinergia entre los discos de CTX, CAZ con el disco AMC para la cepa control positivo ATCC 700603. C: Método de disco combinado, se evidencia una diferencia mayor de 5 mm entre los diámetros de los halos de los discos CTC con CTX y entre CZC con CAZ, para una cepa clínica en estudio. D: Método de disco combinado, se evidencia una diferencia mayor de 5 mm entre los diámetros de los halos de los discos CTC con CTX y entre CZC con CAZ para la cepa control positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603.

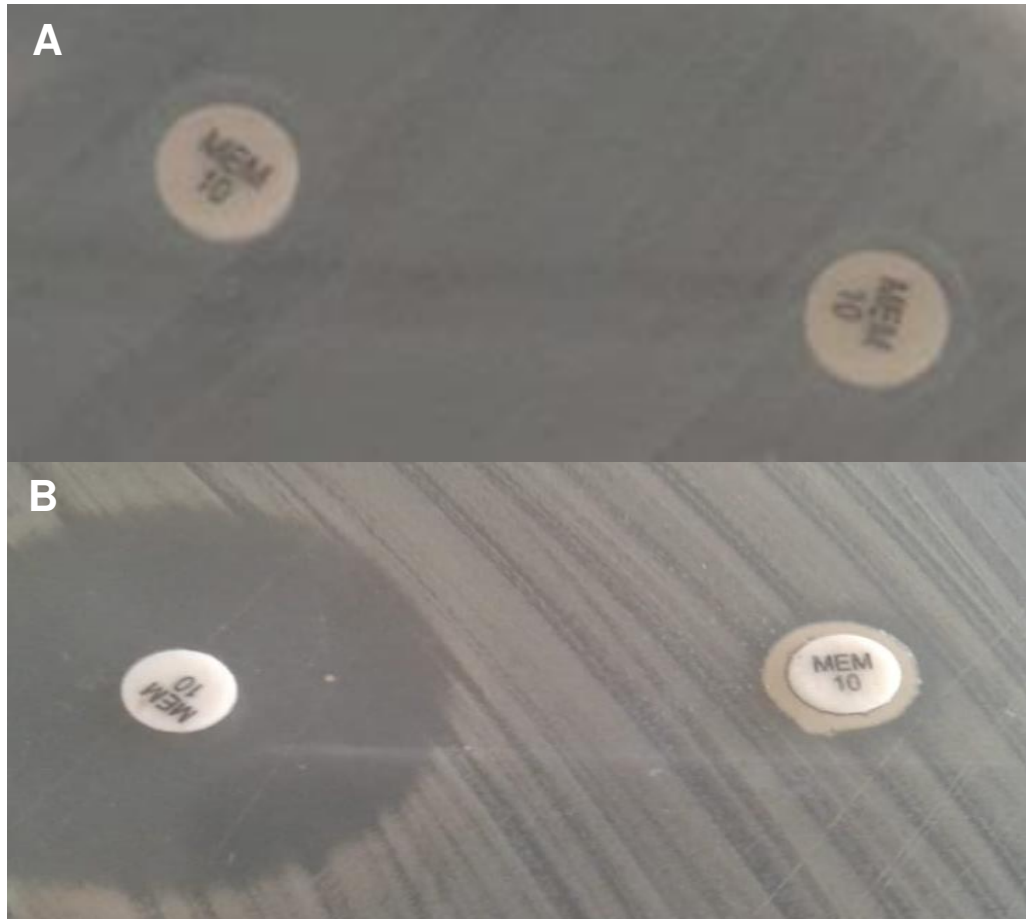


Figura 10. Método modificado de inactivación de carbapenemasas (MICm)

A: Discos de meropenem incubados en suspensión con cepas clínicas en estudio muestra presencia de carbapenemasas al no inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 (cepa sensible a carbapenemes), halo de inhibición = 6mm. B: A la derecha se observa disco de meropenem procedente de la incubación con la cepa control positivo *K. pneumoniae* BAA 1705 mostrando un halo de inhibición = 6mm, a la izquierda se observa el disco de meropenem procedente de la incubación con la cepa control negativo *K. pneumoniae* ATCC 700603 con un halo de inhibición > 18 mm.

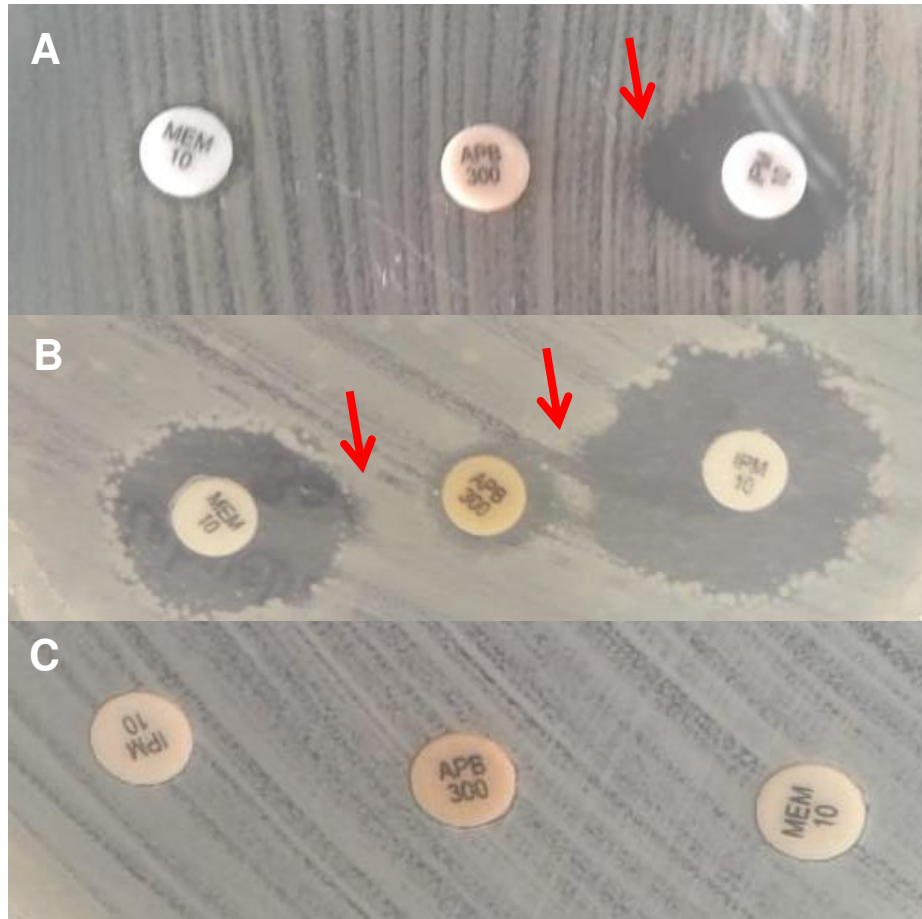


Figura 11. Sinergia a doble disco con ácido fenilborónico (APB)

A: Cepa clínica en estudio donde se evidencia presencia de carbapenemasa tipo A por la sinergia entre el disco de imipenem 10ug (IMP) y el disco de ácido fenilborónico 300 ug (APB), B: Cepa control positivo *K. pneumoniae* BAA 1705, productora de carbapenemasa tipo A (bla_{KPC}), se evidencia sinergia entre el disco de meropenem 10 ug (MEM) e imipenem 10 ug (IMP) con el disco de ácido fenilborónico 300 ug (APB), C: Cepa clínica en estudio donde no se evidencia sinergia entre los discos de meropenem 10 ug (MEM) e imipenem 10 ug (IMP) con el disco de ácido fenilborónico 300 ug (APB).

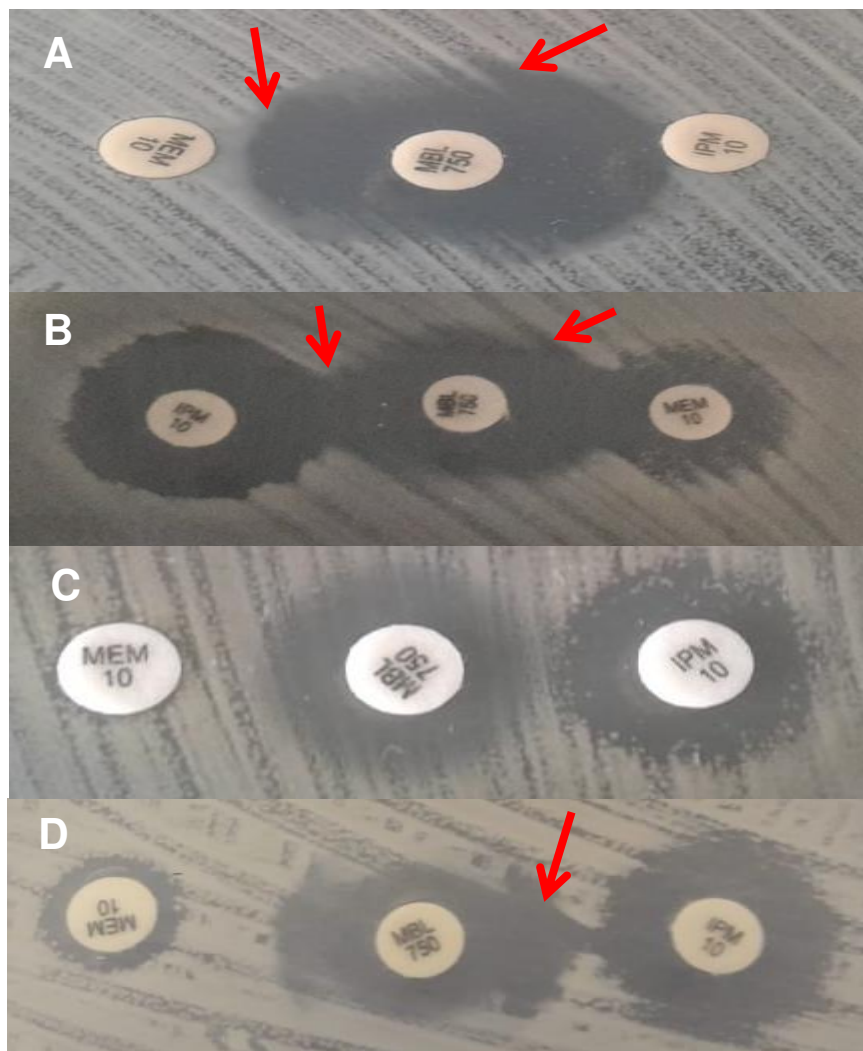


Figura 12. Sinergia a doble disco con el inhibidor etilendiaminotetraacético asociado a mercaptoacetato de sodio (MBL)

A y B: Cepas clínicas en estudio donde se evidencia presencia de metalobetalactamasas por la sinergia entre los discos de carbapenem y el disco MBL, C: Cepa clínica en estudio donde no se evidencia sinergia entre los discos de carbapenem y el disco MBL, D: Cepa control positivo *K. pneumoniae* BAA 2146, productora de metalobetalactamasa (bl_{NDM}), se evidencia sinergia entre los discos de carbapenem con el disco de MBL.

6.4 Confirmación genotípica

La detección genotípica de los genes de resistencia *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM} confirmó la presencia de 20/50 (40%) cepas clínicas en estudio portadoras del gen *bla*_{SHV}, 40/50 (80%) cepas clínicas en estudio portadoras del gen *bla*_{TEM}, 1/50 (2%) cepas clínicas en estudio portadora del gen *bla*_{KPC} y 42/50 (84%) cepas clínicas en estudio portadoras del gen *bla*_{NDM}; 2/50 (2%) cepas clínicas en estudio resultaron negativas para los cuatro genes estudiados, 8/50 (16%) cepas clínicas en estudio solo portaban uno de los cuatro genes en estudio, 24/50 (48%) portaban dos de los cuatro genes en estudio, 15/50 (30%) portaban tres de los cuatro genes en estudio y 1/50 (2%) resultó portadora de los cuatro genes en estudio. (Ver Anexo 5)

6.4.1 Confirmación genotípica de *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}

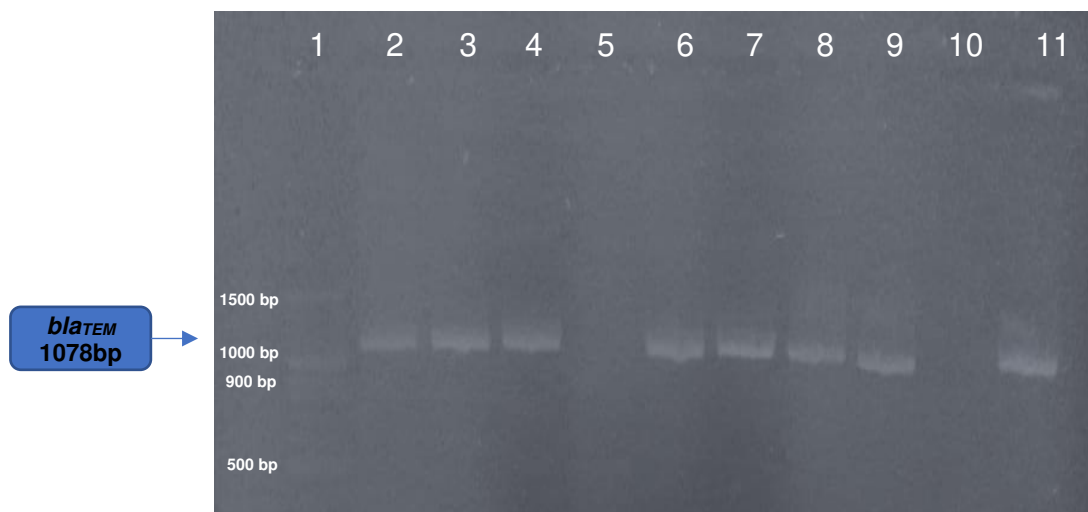


Figura 13. Electroforesis de PCR convencional para el gen *bla*_{TEM} de 1078bp
Pocillo 1: Ladder de 100 pares de bases (bp), Pocillo 2: Control positivo para gen *bla*_{TEM} (*E. coli* ATCC 35218), Pocillos 3,4,6,7,8,9 y 11: Cepas clínicas de *K. pneumoniae* positivas para gen *bla*_{TEM}, Pocillo 5: Cepa clínica en estudio de *K. pneumoniae* negativa para el gen *bla*_{TEM}. Pocillo 10: Blanco.

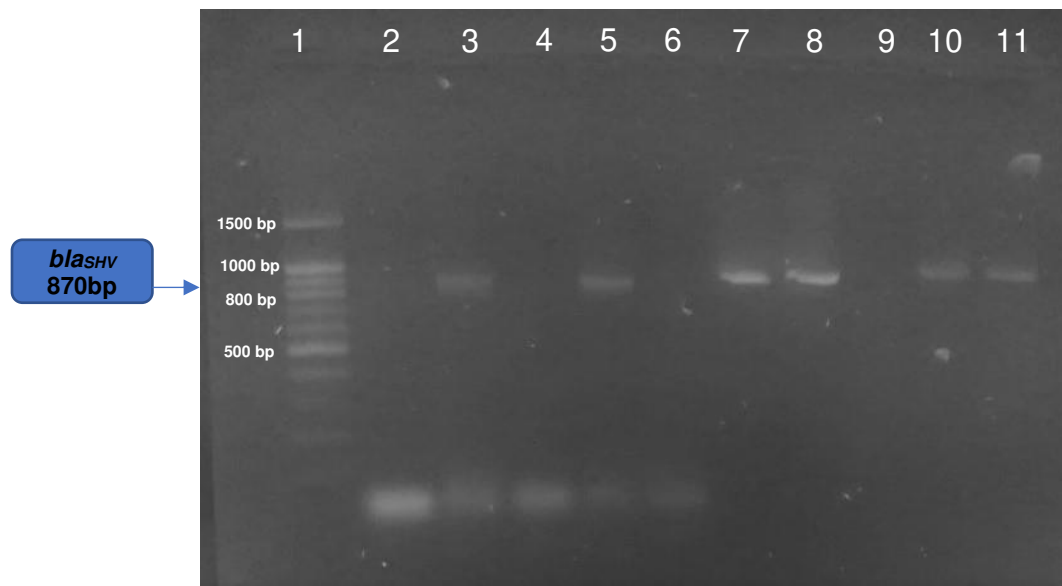


Figura 14. Electroforesis de PCR convencional para el gen *bla_{SHV}* de 870 bp
Pocillo 1: Ladder de 100 pares de bases (bp), Pocillo 8: Control positivo para el gen *bla_{SHV}* (*K. pneumoniae* ATCC 700603), Pocillos: 3,5,7,10,11: Cepas clínicas en estudio de *K. pneumoniae* positivas para el gen *bla_{SHV}*, Pocillos 2,4,6: Cepas clínicas de en estudio de *K. pneumoniae* negativas para el gen *bla_{SHV}*, Pocillo 9: Blanco.

6.4.2 Confirmación genotípica de bla_{KPC} y bla_{NDM}

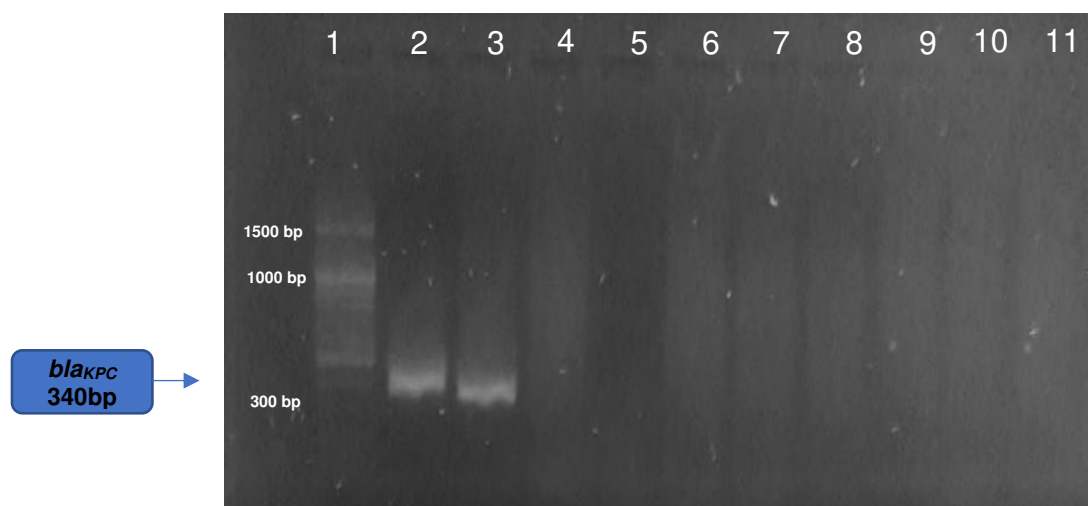


Figura 15. Electroforesis de PCR convencional para el gen bla_{KPC} de 340bp
Pocillo 1: Ladder de 100 pares de bases (bp), Pocillo 2: Control positivo para gen bla_{KPC} (*K. pneumoniae* ATCC 1705), Pocillo 3: Cepa clínica en estudio de *K. pneumoniae* positiva para el gen bla_{KPC}, Pocillos 4,6,7,8,9,10,11: Cepas clínicas en estudio de *K. pneumoniae* negativas para el gen bla_{KPC}, Pocillo 5: Blanco.

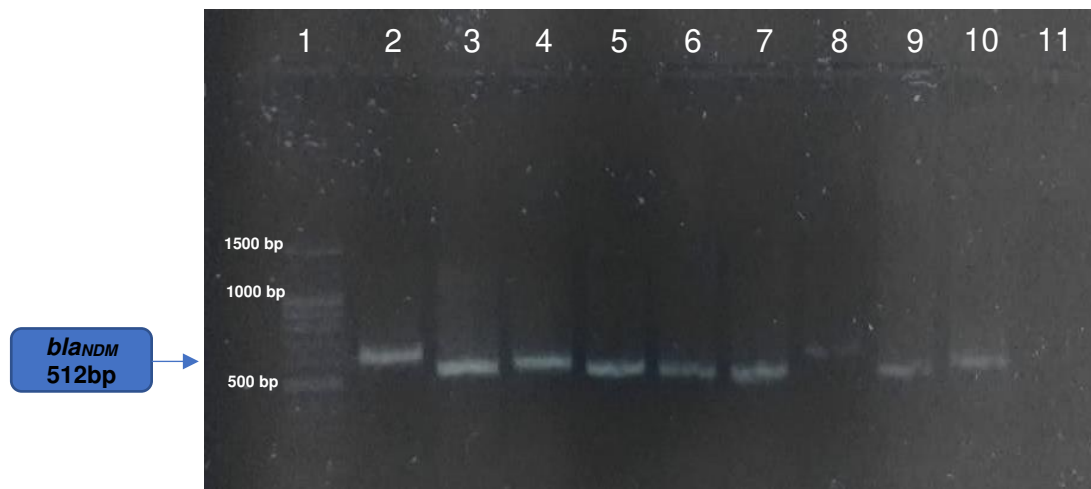


Figura 16. Electroforesis de PCR convencional para el gen *bla*_{NDM} de 512bp
Pocillo 1: Ladder de 100 pares de bases (bp), Pocillo 2: Control positivo para
gen *bla*_{NDM} (*K. pneumoniae* ATCC 2146), Pocillos 3,4,5,6,7,8,9 y 10: Cepas
clínicas de *K. pneumoniae* positivas para gen *bla*_{NDM}, Pocillo 11: Blanco.

VII. DISCUSIÓN

Según los resultados del perfil de susceptibilidad del presente estudio solo 2% (1/50) del total de cepas analizadas fueron resistentes a cefalosporinas y ertapenem, pero sensibles a meropenem e imipenem, indicando posible portador de BLEE, para confirmar la producción de BLEE se usaron los siguientes métodos fenotípicos: Método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas o también llamado Método de Jarlier y el Método de disco combinado o también llamado Método americano ambos métodos confirmaron la presencia de BLEE en 2% (1/50) de cepas sospechosas en el perfil de susceptibilidad; Lezameta et.al realizó un estudio en el cual comparaba 4 métodos fenotípicos para detección de BLEE, dentro de estos se encontraban los dos métodos utilizados en el presente estudio; Lezameta et.al señalan que hubieron 43 cepas que resultaron sospechosas de producción de BLEE en el tamizaje de susceptibilidad, de las cuales, el método de Jarlier y el método americano confirmaron que 62.8% (27/43) era productor de BLEE,³⁸ así como Lezameta et.al diversos estudios utilizan estos métodos como pruebas confirmatorias para la producción de BLEE.^{16, 21, 37, 69}

La cepa resistente a ertapenem, dio negativa en la prueba MIC_m (descarte de carbapenemasas) y mediante PCR se demostró que era portadora de los genes *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*, más no portaba los genes codificantes de carbapenemasas (*bla_{NDM}* y *bla_{KPC}*), lo cual no explicaba su resistencia a ertapenem; sin embargo, esto puede deberse a una baja expresión o pérdida de porinas de la membrana externa (*Ompk35* y *Ompk36*) que facilitan el ingreso de antibióticos al espacio periplásmico de la bacteria; esta baja expresión o pérdida de porinas también se ha descrito como otra causa probable de resistencia a carbapenem y se ha asociado con la producción simultánea de BLEE mediada por plásmidos.¹¹³ Poulou et.al reportan un estudio describiendo un brote epidemiológico de 37 cepas de *K. pneumoniae* productoras de CTX-M-15 (enzima tipo BLEE) resistentes a ertapenem, estos aislamientos eran susceptibles o con resistencia intermedia al meropenem, pero todas las cepas eran susceptibles al imipenem. La amplificación y secuenciación de PCR verificó la presencia del gen *bla_{CTX-M-15}* en todos los aislados de *K. pneumoniae*, no se detectaron otros genes codificantes de BLEE,

carbapenemasa o AmpC. Los autores reportan que esta resistencia a ertapenem está ligada a una interrupción en la expresión del gen ompK35, así como la presencia de una variante en la porina tipo OmpK36, además de la producción de una enzima tipo BLEE.¹⁴⁰

Para realizar la identificación fenotípica de carbapenemasas se usó el MICm según las recomendaciones del CLSI debido a su alta sensibilidad y especificidad,¹²⁸ como lo confirman numerosos estudios, Li J et.al en China en el 2015 reportaron una especificidad del 95.5% usando el MICm, ya que se obtuvo una alta compatibilidad entre este método fenotípico y el PCR; sin embargo, se reportó un cepa falso positivo por MICm ya que dio negativa en el PCR para los cinco genes estudiados³⁴; en el presente estudio se identificó 49 cepas productoras de carbapenemasas por MICm y mediante PCR 86% (43/49) eran productoras de los genes bla_{NMD} y bla_{KPC}, quedando por confirmar seis cepas que podrían ser productoras/coproductoras de otros tipos de carbapenemasas, como las metalobetalactamasas bla_{IMP} o bla_{VIM}, reportadas a nivel mundial²⁷ y habiendo ya un caso (bla_{IMP}) reportado en Perú⁴⁸; carbapenemasas de clase D tipo OXA, prevalentes en otros países pero actualmente con presencia desconocida en *K. pneumoniae* en Perú ya que no se han reportado casos;¹⁴¹ o podrían estar ligadas a otro tipo de mecanismo de resistencia como la pérdida o baja expresión de porinas.¹¹⁴

El método de Inactivación de carbapenemasas se considera un método fácil de realizar y de interpretar en un Laboratorio de Microbiología, además de su bajo costo, posee un mayor porcentaje de sensibilidad sobre el Test de Hodge modificado, el cual ha sido muy usado en Latinoamérica y el Perú para el descarte de carbapenemasas, pero este método ha reportado baja sensibilidad y especificidad para identificar la presencia de carbapenemasas de clase B (metalobetalactamasas tipo NDM), como lo demuestran los estudios en Perú de Resurrección et.al⁴⁷ y Sacsquispe et.al⁴⁸ donde el Test de Hodge no fue efectivo para demostrar la presencia de este tipo de carbapenemasa; contrario a los resultados que se obtuvieron en el presente estudio con el MICm ya que si dio resultados positivos en las cepas productoras de

metalobetalactamasas que fueron luego confirmadas por PCR como portadoras del gen *bla_{NDM}*.

Para la diferenciación fenotípica entre carbapenemasas de alta prevalencia como lo son las metalobetalactamasas y serinocarbapenemasas, se usaron dos métodos de sinergia a doble disco con inhibidores, uno contenía EDTA-SMA y el otro APB, estos métodos también fueron utilizados en Perú por Resurrección et.al donde se detalla que estos métodos fenotípicos de descarte fueron muy efectivos al identificar 9/9 cepas de *K. pneumoniae* como productoras de metalobetalactamasas y 0/9 negativas para serinocarbapenemasas, resultados que se confirmaron molecularmente ya que todas las cepas poseían el gen *bla_{NDM}* (metalobetalactamasa) y ninguna portaba el gen *bla_{KPC}* (serinocarbapenemasa);⁴⁷ estos resultados se aproximan a los obtenidos en el presente estudio ya que en la prueba para metalobetalactamasas dieron positivas 48 cepas de las cuales se confirmó por PCR que 42 portaban el gen *bla_{NDM}*; por otro lado, solo una cepa dio positiva para la prueba de serinocarbapenemasas confirmándose por PCR que portaba el gen *bla_{KPC}* pero también resultó portadora del gen *bla_{NDM}*.

En un estudio realizado por Pantoja K et.al¹⁴ en Bogotá se obtuvo como resultado, 31 cepas de *K. pneumoniae* identificadas como BLEE, a través del PCR se obtuvo que 64.5% (20/31) portaba el gen *bla_{TEM}* y 80.6% (25/31) el gen *bla_{SHV}*; en su mayoría el 42% (13/31) de las cepas eran procedentes de muestras de orina, 45% (14/59) pertenecían al servicio de UCI. Por otro lado, en Brasil, Flores C et.al¹⁵ reportan un estudio donde se obtuvieron 70 aislamientos de *K. pneumoniae*, las cuales a través de PCR 67.14% (47/70) portaban el gen *bla_{SHV}*, 62.8% (44/70) *bla_{TEM}* y 56% (39/70) *bla_{KPC}*, todas las cepas eran procedentes del servicio de UCI y de muestras de hisopado rectal. Ambos estudios reportan al gen *bla_{SHV}* predominante sobre el gen *bla_{TEM}*. Por el contrario, el presente estudio reporta que de 50 cepas de *K. pneumoniae* analizadas, 80% (40/50) portaban el gen *bla_{TEM}*, resultando predominante sobre el gen *bla_{SHV}*, que se presentó en un 40% (20/50), también se reporta que 2% portaba el gen *bla_{KPC}* y 84% el gen *bla_{NDM}*; asimismo, 48% (24/50) de las cepas fueron procedentes de muestras de hisopado rectal y 52% (26/50) eran de origen sistémico, destacando dentro de estos que 12% (6/50) eran procedentes de muestras de secreciones de

herida y solo 10% (5/50) de orina; solo 12% (6/50) de las cepas eran procedentes del servicio de Cuidados Intensivos, siendo este último resultado de amplia diferencia con los dos estudios antes mencionados.

El estudio realizado por Sacsquispe et.al en diferentes hospitales del Perú, demuestra que 72.7% (40/55) de cepas de *K. pneumoniae* analizadas fueron positivas para el gen *bla*_{NDM} y 25.5% (14/55) para el gen *bla*_{KPC}, el resultado del gen *bla*_{NDM} se aproxima al obtenido en el presente estudio ya que 84% (42/50) de las cepas *K. pneumoniae* estudiadas portaban el gen *bla*_{NDM} pero solo el 2% (1/50) resultó positiva para gen *bla*_{KPC},⁴⁸ notando en este último una diferencia importante al compararlo con el estudio de Sacsquispe et.al; sin embargo, ambos estudios demuestran una mayor prevalencia del gen *bla*_{NDM} sobre el gen *bla*_{KPC}.

La coexpresión de los cuatro genes en estudio (*bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}) en la cepa clínica estudiada presenta en el perfil de susceptibilidad resistencia a amikacina y tigeciclina diferenciándose de las demás que presentan sensibilidad a estos antibióticos, aparte de la sensibilidad a colistina que presentan todas las cepas en estudio, estos resultados concuerdan con el reciente estudio publicado en Turquía en el 2019 donde se dio a conocer 10 cepas clínicas de *K. pneumoniae* coproductora de *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM} además de transportar los genes tipo BLEE (*bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) y *rmtC* (gen asociado con la resistencia a aminoglucósidos), estas cepas resultaron ser todas resistentes a amikacina pero solo dos fueron resistentes a tigeciclina y una poseía una resistencia intermedia según el antibiograma, seis de estas cepas llegaron a presentar resistencia a colistina.³⁵

Existen dos reportes de la coproducción de *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM} en China, uno se dio en un paciente de 58 años, siendo la cepa resistente a todos los carbapenemes, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y macrólidos³¹; resultado similar al del presente estudio donde la cepa coportadora de ambos genes también presenta resistencia a carbapenem (meropenem, imipenem, ertapenem), fluoroquinolonas (levofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacina), aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina) y sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprima). Por otro lado,

de Li J. et.al.³⁴ aislaron dos cepas de *Klebsiella oxytoca* que de igual manera eran coportadoras de los genes bla_{KPC} y bla_{NDM}, estas cepas fueron positivas para la prueba MIC_m más no dieron resultados positivos en la prueba de MIC_e (Método de inactivación EDTA-carbapenem, prueba para descarte de metalobetalactamasas), denotando que se tratarían de cepas productoras de serinocarbapenemasas; sin embargo, estas cepas si dieron positivas para otra prueba que también descarta metalobetalactamasas (disco combinado con EDTA + meropenem), indicando luego presencia de metalobetalactamasas, los investigadores resaltan que la prueba de MIC_e y las pruebas de disco combinado con inhibidores (APB-EDTA) con carbapenem no serían efectivas para determinar la presencia de una cepa coproductora de carbapenemasa y serinocarbapenemasa; este resultado es similar al presente estudio ya que en la prueba de MIC_m la cepa coportadora de los genes bla_{KPC} y bla_{NDM} también dio positiva; sin embargo, no se pudo detectar la presencia de la metalobetalactamasa por las pruebas de sinergia con inhibidores (APB-EDTA), ya que dio negativo para metalobetalactamasas y positivo para serinocarbapenemasas.

Por otro lado, a nivel de Latinoamérica en Brasil se han reportado ambos genes, pero en una cepa de procedencia rectal de *Enterobacter hormaechei*.³² No se han reportado estudios de la coproducción de bla_{NDM} y bla_{KPC} en el Perú.

VIII. CONCLUSIONES

Se determinó que 2% (1/50) de las cepas en estudio presentaba el fenotipo de la presencia de betalactamasas de espectro extendido (Método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas y método de disco combinado) y se confirmó mediante PCR convencional que 80% (40/50) de las cepas portaban el gen bla_{TEM} y 40% (20/50) portaban el gen bla_{SHV}.

Se determinó que 98% (49/50) de las cepas en estudio presentaban el fenotipo de la presencia de carbapenemasas (Método modificado de inactivación de carbapenemasas), de las cuales el 96% (48/50) resultaron positivas en la prueba fenotípica para metalobetalactamasas (Método de Sinergia a doble disco con ácido etilendiaminotetraacético asociado a mercaptoacetato de sodio) y el 2% (1/50) resultó positiva en la prueba fenotípica para enzimas carbapenemasas tipo A (Método de sinergia a doble disco con ácido fenilborónico) y se confirmó mediante PCR convencional que el 2% (1/50) de las cepas portaba el gen bla_{KPC} y el 84% (42/50) portaban el gen bla_{NDM}.

IX. RECOMENDACIONES

Los Laboratorios de Microbiología de los hospitales deben implementar equipos, instrumentos y reactivos necesarios para el desarrollo de métodos fenotípicos y técnicas moleculares las cuales permitan la identificación rápida y precisa y continua de genes bacterianos implicados en la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas.

Se debe investigar en aislamientos de *K. pneumoniae*, la presencia de genes que codifican otras betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas diferentes a los estudiados tales como los genes bla_{CTX}, bla_{IMP} y bla_{VIM}, bla_{OXa} también reportadas en *K. pneumoniae*.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocha C, Reynolds ND, Simons MP. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015; 32(1): 139-45. DOI: 10.17843/rpmesp.2015.321.1586
2. Instituto Nacional de Salud. Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2017-2021. [Internet]. 2017 [Citado el 27 de Septiembre del 2019]. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/GestionURMTrabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacionalATM-2017-2021.pdf>
3. González C, et al. Brote por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente y productora de betalactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. *Rev Chil Infectol*. 2011; 28(1): 28-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000100005>
4. Echeverri T, León S, Muñoz A, Robledo J. *K. pneumoniae* y betalactamasas. Un problema creciente. *MEDICINA UPB*. 2009; 28(2): 137.
5. Rojas J. Identificación fenotípica y caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* durante un brote hospitalario en Madre de Dios, Perú. *Científica*. 2016; 13 (3): 187-192. DOI: <https://doi.org/10.21142/cient.v13i3.387>
6. Tejada PJ, et al. Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *An Fac med*. 2015; 76(2):161-166. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v76i2.11143>
7. Padilla M. Detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante el método de Jarlier. 2011;16(84):7-12.
8. Josa D, Bustos G, Torres I, Esparza G. Evaluación de tres métodos de tamizaje para detección de *Enterobacteriaceae* productoras de

- carbapenemasas en hisopados rectales. *Rev Chilena Infectol.* 2018; 35 (3): 253-261. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000300253>.
9. Córdova E, et al. Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(7): 376–379. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.12.003.
 10. Organización Panamericana de la Salud. Perfil del país Perú: Resistencia antimicrobiana [Página web]. Washington D.C. 2009. Acceso 16 de Mayo del 2018. Disponible en: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Perfil_de_pais_Peru.pdf
 11. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews.* 2005;18(4):657-686. DOI: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
 12. Philippon A, Labia R, George J. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1989. 33(8). 1131-1136. DOI: 10.1128/aac.33.8.1131.
 13. Akpaka P, Legall B, Padman J. Molecular detection and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase genes prevalent in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Trinidad & Tobago. *West Indian Med J* 2010; 59 (6): 592.
 14. Pantoja K, Segura J, Bettin L, Coriat J, Diez H. Frecuencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes hospitalizados en una clínica de tercer nivel en Bogotá. *CienciActual.* 2015; 4 :1-9. DOI: 10.21500/2248468X.2285.
 15. Flores C, et al. Detection of antimicrobial resistance genes in betalactamase- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2016; 52(5):284-292. DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160049>.

16. Nepal, et al. Extended spectrum beta-lactamase and metallo beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical samples in a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017; 16 (1): 62. DOI: 10.1186/s12941-017-0236-7.
17. Vera A, et.al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Rev Chilena Infectol.* 2017; 34(5): 476-484. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>.
18. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7.
19. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2001;45(4):1151-1161. DOI:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.
20. Bradford PA, et.al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(1): 55-60. DOI:10.1086/421495.
21. Woodford N, Tierno PM, Young K, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4793-9. DOI:10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004.
22. Bratu S, et.al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56 (1): 128-32. DOI:10.1093/jac/dki175.
23. Virginia Villegas M, Lolans K, Correa A, et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006; 50(8): 2880-2882. DOI: 10.1128/AAC.00186-06.

24. Marcano D, De Jesus A, Hernandez L, Torres L. Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to B-lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:529-534.
25. Iregui A, Ha K, Meleney K, Landman D, Quale J. Carbapenemases in New York City: the continued decline of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, but a new threat emerges. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73(11): 2997-3000. DOI: 10.1093/jac/dky322.
26. Ferreira RL, da Silva BCM, Rezende GS, et al. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Front Microbiol*. 2019; 9: 3198. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03198.
27. Lee CR, et.al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol*. 2016; 7: 895. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00895.
28. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(12):5046-5054. DOI: 10.1128/AAC.00774-09.
29. Castanheira M, et.al. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;55(3):1274-1278. DOI: 10.1128/AAC.01497-10.
30. Seara N, et.al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015; 46(2): 169–173. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.001.
31. Liu Y, et.al. First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital.

- Epidemiol Infect. 2015; 143(2): 376-384. DOI: 10.1017/S0950268814000995.
32. Silva P. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. MICROBIAL DRUG RESISTANCE. 2015; 21(2): 234-236. DOI: 10.1089/mdr.2014.0171.
 33. Wei D, Wan La, Liu Y. Draft Genome Sequence of an NDM-1- and KPC-2-Coproducing Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from Burn Wound Infections. Genome Announc. 2018; 6(13): e00192-18. DOI: 10.1128/genomeA.00192-18.
 34. Li J, et al. Performance of modified carbapenem inactivation method and inhibitor-based combined disk test in the detection and distinguishing of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Ann Transl Med. 2019; 7(20): 566. DOI: 10.21037/atm.2019.09.43.
 35. Tekeli A, Dolapci I, Evren E, Oguzman E, Ceren Z. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. MICROBIAL DRUG RESISTANCE. 2019; 0(0): 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0086>.
 36. Calderón R, et.al. Caracterización Molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo shv-5 en una unidad de cuidados intensivos neonatal de lima. Rev peru med exp salud pública. 2003; 20 (3): 121-127.
 37. Morales J, Reyes K, Monteghirfo M, Roque M, Irey J. Presencia de β -lactamasas de espectro extendido en dos hospitales de Lima, Perú. An Fac Med. 2005; 66(1):24-32.
 38. Lezameta L, Gonzáles E, Tamariz J. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de Betalactamasas de espectro extendido. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(3): 345-51. DOI: 10.1590/S1726-46342010000300006.
 39. Rivera M, Rodriguez C, Flores R, Serquén L, Arce Z. Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli*

aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. Rev. Perú. med. exp. salud pública. 2015; 32(4): 752-755.

40. Instituto Nacional de Salud del Niño. Detección y caracterización molecular betalactamasas de espectro extendido en *E. coli* y *K. pneumoniae* AISLADAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO [Internet]. Lima. [Citado 27 de Agosto del 2019]. Disponible en: <http://www.insn.gob.pe/sites/default/files/investigaciones/desarrollo/informe%2018/Informe%20Final%20TO-06-2009.pdf>.
41. Grandez JA, et. al. Situación del mapeo Microbiológico de uro cultivos en un Hospital referencial de Perú 2013-2015. Rev. Fac. Med. Hum. 2018; 18(1): 45-51. DOI: 10.25176/RFMH.v18.n1.1268.
42. Organización Panamericana de la Salud. Perfil del país Perú: Resistencia Antimicrobiana [Internet]. 2009 [Citado el 16 de Mayo del 2018]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Perfil_de_pais_Peru.pdf.
43. MINSA. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario-2012. [Internet]. 2012 [Citado el 16 de Mayo del 2018]. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/cnsp_resanti_informesdevigilancia/INFORME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf.
44. MINSA. Protocolo para detección de KPC en enterobacterias [Internet]. 2014 [Citado el 16 de Mayo del 2018]. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/cnsp_resanti_documentos_tecnicos/protocolo%20deteccion%20de%20%20KPC%20en%20enterobacterias%202014.pdf.
45. Velasquez J, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Rev Soc Med Interna. 2013; 26(4): 192-196.
46. Horna G, et.al. Characterisation of the first KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 from Peru. J Glob Antimicrob Resist. 2017; 9: 36-40. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.12.011.

47. Resurrección C, et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo: Lima, Perú. Rev Perú med exp salud pública. 2017; 34(2): 261-267. DOI: 10.17843/rpmesp.2017.342.2615.
48. Sacsquispe R, Bailón H. Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2017; 35(2): 259-64.
49. Merino L, Lösch L. Familia Enterobacteriaceae. Universidad Nacional del Nordeste - Facultad de Medicina - Microbiología e Inmunología. [Internet]. [Citado el 25 de Mayo del 2019]. Disponible en: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf>
50. Puerta A, Mateos F. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete. España. Medicine. 2010; 10(51): 3426-3431
51. Huertas M. Análisis y caracterización de genes de *Klebsiella pneumoniae* implicados en de biopelículas. [Tesis de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2014. 156p.
52. Lopardo H, Predari S, Vay C. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología [Internet]. [Citado el 02 de Abril del 2019]. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
53. Sierra E. Tipificación de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* por la técnica de “Multilocus Sequence Typing” [Tesis de grado]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2016. 90p.
54. Padilla M. *Klebsiella pneumoniae*: Aislamiento, identificación y resistencia a los antimicrobianos Hospital “Jaime Mendoza”.C.N.S. Archivos Bolivianos de Medicina. 2013; 19(87): 30-36.
55. Falconi A, Nolasco M, Bedoya A. Factores asociados a bacteriemia por enterobacterias productoras de BLEE en pacientes internados en un

- Hospital General de Lima [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017. 22p.
56. Koneman E. Diagnóstico microbiológico. 6a ed. España: Ed Médica Panamericana; 2006.
 57. Chávez J. Caracterización molecular del gen de la β -Lactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae*. [Tesis de grado]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2015. 257p.
 58. Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology. 2003; 149(Pt 9): 2397–2405. DOI: 10.1099/mic.0.26434-0.
 59. Paterson DL, et.al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. Ann. Intern. Med. 2004; 140(1): 26–32. DOI: 10.7326/0003-4819-140-1-200401060-00008.
 60. Ashurst J, Dawson A. Neumonia, *Klebsiella pneumoniae*. [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [revisado 2019, citado 20 de Marzo del 2019]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>.
 61. Lee CR, et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7: 483. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00483.
 62. López J, Echeverri T. *Klebsiella pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. IATREIA 2010;23(2):157-165.
 63. Izquierdo L. Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2003. 177p.
 64. Hansen DS, et al. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. J. Clin. Microbiol. 1999; 37(1): 56–62.

65. Cubero M. Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2015. 258p.
66. Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol.* 2010; 18(5): 224–232. DOI: 10.1016/j.tim.2010.03.002.
67. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 991–1002. DOI: 10.2217/fmb.12.74.
68. Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(12): 1717–1727. DOI: 10.1086/588383.
69. Pereira A, Fariña N, Vega M, González P, Rodríguez F, Figueredo L. Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes ambulatorios y hospitalizados en un Laboratorio privado de Asunción. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2016; 14(1): 17-24. DOI: [http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)17-024](http://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)17-024).
70. Bengoechea J, Llobet E. Papel del lípido A de *Klebsiella pneumoniae* en el control de la respuesta inmune. [Tesis doctoral]. Palma de Mallorca: Universitat de Les Illes Balears; 2014.9p.
71. Zander D, Farver C. Pulmonary Pathology [Internet]. Ohio: Elsevier; 2018 [Revisado 2018, citado 25 de Agosto del 2019]. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/klebsiella-pneumoniae?fbclid=IwAR3CtPMQXiQtcbmUmMzNO7oYttBzdF_k2-PzKAg5uhnyWqrPaKZBfNFPF18
72. Ruiz I. Importancia sanitaria de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas a nivel hospitalario [Tesis de grado]. Universidad de la Laguna. 33p.
73. Rizk N, Kanafani Z, Tabaja H, Kanj S. Extended infusion of beta-lactam antibiotics: optimizing therapy in critically-ill patients in the era of antimicrobial

- resistance. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2017; 15(7): 645-652. DOI: 10.1080/14787210.2017.1348894.
74. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(1) :44–5245. DOI:10.1016/j.eimc.2008.11.001.
 75. Bush K, Bradford P. b-Lactams and b-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspect Med*. 2018; 6(8): 1-28. DOI:10.1101/cshperspect.a025247.
 76. Reed S. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4 ed. Washington: Sanders; 2006.
 77. Craig W, Andes D. Cephalosporins- Principles and Practices of Infectious Diseases. Saunders. 2015; 8(1): 278-292.
 78. Codjoe F. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci*. 2018; 6(1). 1-28.
 79. Zhanel G, et.al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007; 67: 1027-1052.
 80. El-Gamal M, et.al. Recent updates of carbapenem antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;13: 185-195.
 81. Sauberan J, Bradley J. *Antimicrobial Agents. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 2018. 1499-1531.
 82. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2018 [Citado 11 de Abril del 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>.
 83. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones Médicas*. 2008; 12(3): 217-226.
 84. Pulzova L, Navratilova L, Comor L. Alterations in Outer Membrane Permeability Favor Drug-Resistant Phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*. 2017; 23(4): 413-420. DOI: 10.1089/mdr.2016.0017.

85. Fernández L, Breidenstein E, Hancock R. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*. 2011;14(1): 1-21. DOI: 10.1016/j.drug.2011.01.001.
86. Cheng H, Chen Y, Peng H. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrDPmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of Biomedical Science*. 2010; 17(60): 1-16. DOI: 10.1186/1423-0127-17-60.
87. Rice L. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*. 2002; 87(2): 198-208. DOI: 10.1016/j.mayocp.2011.12.003.
88. Jeon J, et.al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(5): 9654–9692. DOI: 10.3390/ijms16059654.
89. Ghafourian S, Sadeghifard, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2015; 17: 11-22.
90. De Jesus M, Ehlers M, Dos Santos R, Kock M. Review - Understanding β -lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Resistance-un open challenge*. 2015. 51-83. DOI: 10.5772/61852.
91. Abarca G, Herrera M. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños*. 2011; 36(1-2).
92. Handson N, Sanders C. Regulation of Inducible AmpC β -lactamase Expression Among Enterobacteriaceae. *Curr. Pharmac Design*. 1999; 5(11): 881-94.
93. Reisbig M, Hanson N. The ACT-1 plasmid-encoded AmpC beta-lactamase is inducible: detection in a complex beta-lactamase background. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49(3): 557-560.
94. Verdet C, et.al. Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella spp.* in the Parisian region: genetic organization of the ampC and ampR genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(2): 607-617. DOI: 10.1128/AAC.50.2.607-617.2006.

95. Reisbig M, Hossain A, Hanson N. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of Enterobacter origin. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(5):1141-1151. DOI: 10.1093/jac/dkg204.
96. Fortineau N, Poirel L, Nordman P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2001; 47(2): 207-211. DOI: 10.1093/jac/47.2.207.
97. Ghanavati R, et.al. First report of coexistence of AmpC beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from burn patients. Acta Microbiológica et Immunologica Hungarica. 2017; 64(4): 445-462. DOI: 10.1556/030.64.2017.028.
98. Evans B, Amyes S. OXA β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014; 27(2): 241-263. DOI: 10.1128/CMR.00117-13.
99. García C, Pardos M, Castillo F. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(1).
100. Elmowalid G, et al. Molecular Detection of New SHV β -lactamase Variants in Clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Egypt. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2018; 60:35-41. DOI: 10.1016/j.cimid.2018.09.013.
101. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol. 2016; 1367:1374. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01374.
102. Rawaty D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. J Glob Infect. 2010; 2(3): 263-274. DOI: 10.4103/0974-777X.68531.
103. Rahman S, et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. Hindawi BioMed Research International. 2018;(1):1-14. DOI: 10.1155/2018/9519718.
104. Chang-Ro L, et.al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options,

- and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016; 7: 895. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00895.
105. Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA, Van Den Akker F. Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases. *Biochemistry*; 2007; 46(19): 5732–5740. DOI: 10.1021/bi700300u.
 106. Jeong H. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *Int JMol Sci.* 2015; 16(5): 9654-9692. DOI: 10.3390/ijms16059654.
 107. Khan A, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology.* 2017; 17(1): 101. DOI: 10.1186/s12866-017-1012-8.
 108. Zhang H, et.al. Active-Site Conformational Fluctuations Promote the Enzymatic Activity of NDM-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2018; 62 (11): 1-12. DOI: 10.1128/AAC.01579-18.
 109. Schulz G. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys.* 2002; 1565(2): 308–317. DOI: 10.1016/s0005-2736(02)00577-1.
 110. Achouak T, Pages H. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol.* 2001; 199(1): 1–7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x.
 111. Domenech A, et.al. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 1999; 181(9): 2726–2732.
 112. Martinez L, et.al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum betalactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 46(12): 3926–3932. DOI: 10.1128/aac.46.12.3926-3932.2002.
 113. Garcia L, Juan C, Domenech A, Alberti S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(4): 1803–1805. DOI: 10.1128/AAC.01441-10.

114. Kaczmarek M, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz T. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(19): 3396–3406. DOI: 10.1128/AAC.00285-06.
115. Bialek S, et.al. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(19): 4373–4378. DOI: 10.1128/AAC.01607-09.
116. Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51(1): 9–11. DOI: 10.1093/jac/dkg050.
117. Paulsen T, Chen J, Nelson K, Saier M. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 3(2): 145–150.
118. Pages J, et.al. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One.* 2009; 4(3): e4817. DOI: 10.1371/journal.pone.0004817.
119. Percival S, Suleman L, Donelli G, Vuotto C. Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology.* 2015; 64(4): 323–334. DOI: 10.1099/jmm.0.000032.
120. Alcántar M, et.al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence.* 2013; 4(2): 129–138. DOI: 10.4161/viru.22974.
121. Yauri M, Alcocer L, Rodríguez M. Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes. *Rev. Ecuatoriana de medicina y Ciencias Biológicas.* 2016; 37 (2): 31-38.
122. Guzmán M, Alonso G. Caracterización de la región variable de integrones clase 1 presentes en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev*

- Med Chile. 2010; 138: 322-329. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010000300010>.
123. Ramos U, Silva J, Martínez E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Rev.Salud Publica Mex. 2009; 51(3):439-446.
 124. Rada AM, Hernández C, Restrepo E, Villegas M. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. Rev. Biomédica. 2019; 39(1):199-220. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>.
 125. Millán B, Castro D, Araque M, Ghiglione B, Gutkind G. IS CR1 asociado con genes blaCTX-M-1 y blaCTX-M-2 en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen hospitalario en Mérida, Venezuela. Rev. Biomédica. 2013; 33(2): 268-275. DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.774>.
 126. Ricaurte A. Análisis de los elementos genéticos involucrados en la movilización del gen blaNDM-1 en bacterias multirresistentes colombianas. [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Nacional de Colombia. 2017. 9p.
 127. Alvarez D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2010; 9(4): 516-524.
 128. Clinical & Laboratory Standards Institute. Un nuevo test fenotípico para la detección de carbapenemasas – The Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) [Internet]. 2017; 2(1). [Citado el 10 de Junio del 2018]2017. Disponible en: https://clsi.org/media/1869/ast_newsletter_sp3.pdf.
 129. Nicola F, Nievas J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. Rev. argent. microbiol. 2012; 44(4): 290-302.
 130. Saavedra S, Duarte C, González M, Realpe M. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. Biomédica. 2014; 34 (Suppl 1): 217-223. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>.

131. Yauri K. Desempeño de cinco métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en bacilos gram negativos tipificados genotípicamente [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. 64p.
132. Mlynarcik P, Roderova M, Kolar M. Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9(1): e29314. DOI: 10.5812/jjm.29314.
133. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, Mohkam M. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum b-lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in intensive care units of a referral hospital in Shiraz, Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2013; 6(9): 703-708. DOI: doi: 10.1016/S1995-7645(13)60122-4.
134. Dashti, et al. Heat Treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for Molecular Techniques. Kuwait Medical Journal. 2009; 41(2): 117-122.
135. Gil Z. Llontop J. Benavides E. López E. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* B- lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo –Perú. Rev.cuerpo med. 2014;7(3):28.
136. Kim J, Lee H. Rapid Discriminatory Detection of Genes Coding for SHV b-Lactamases by Ligase Chain Reaction. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000; 4(7): 1860-1864. DOI: 10.1128/aac.44.7.1860-1864.2000.
137. Jain A, Mondal R. TEM & SHV genes in extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* species & their antimicrobial resistance pattern. Indian J Med Res. 2008;128: 759-764.
138. Pasteran F, et al. Emergence of NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. J. Antimicro Chemother. 2012; 67(7): 1795–7. DOI: 10.1093/jac/dks101.
139. Arbizú, et.al. Nueva Dehli metalo- β -lactamasa en especies en *Enterobacteriaceae* aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua. Acta Medica Costarricense. 2018; 60(2):15-18.

140. Poulou A, et.al. Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(10): 3176-3182. DOI: 10.1128/JCM.01244-13.
141. Gonzales J. Genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias: ¿Conocemos realmente la prevalencia de carbapenemasas en Perú?. 2018; 35(4): 707-708. DOI: <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.354.3918>.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 13. Materiales y equipos de laboratorio

Discos de antibióticos	Equipos	Otros materiales
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disco de antibiótico de Ceftazidima (CAZ) (30 µg)- Andina Medica ✓ Disco de antibiótico de Cefotaxima (CTX) (30 µg)- Andina Medica ✓ Disco de antibiótico Amoxicilina/ Ácido Clavulánico (AMC) (20/10 µg)- Andina Medica ✓ Disco de antibiótico Ceftazidima/ Ácido Clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10µg)-Andina Médica ✓ Disco de antibiótico de Cefotaxima / Ácido Clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10µg)-Andina Medica ✓ Disco de antibiótico de Imipenem (IMP) (10 µg)- Andina Medica ✓ Disco de antibiótico de Meropenem (MEM) (10 µg)- Andina Medica ✓ Disco de antibiótico de Ácido etilendiaminotetraacético-Mercaptoacetato de sodio (EDTA-SMA) (750 µg -2mg)- Andina Medica ✓ Disco de antibiótico de Ácido 3-aminofenilborónico (APB) (300 µg)- Andina Medica 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cabina de extracción-Telstar Bio II Advance ✓ Estufa a 37°C-Incucell ✓ Balanza analítica – Sartorius ✓ Baño María-J.P.SELECTA,s.a. ✓ Refrigeradora- BOSH ✓ Congeladora -BOSH ✓ Centrifuga-Model: PLC-012E ✓ Termociclador-Eppendorf ✓ Materycler personal ✓ Equipo de electroforesis-Biometra ✓ Transiluminador UV para electroforesis -Biometra ✓ Autoclave-ALP model 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Micropipeta Transferpette de 0.5-10uL-BRAND Bolsas de Polietileno ✓ Micropipeta Transferpette de 5-50uL-BRAND ✓ Placas Petri descartables-EuroLab ✓ Frascos de 250 y 500mL ✓ Asa de siembra de plástico ✓ Asa de siembra de Kohle ✓ Tubos de ensayo de vidrio (Borosilicato) de 10mL ✓ Probetas de 100mL y 250mL ✓ Tubos de eppendorf de 2mL ✓ Hisopos estériles ✓ Gradillas ✓ Crioviales con tapa rosca ✓ Pinzas estériles ✓ Mechero ✓ Algodón
Medios de cultivo	Reactivos	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agar Tripticasa de Soya (TSA)- MERCK ✓ Caldo Tripticasa de Soya (TSB)- OXOID ✓ Agar Mueller Hinton (MHA)- MERCK ✓ Agar Citrato de Simons-MERCK ✓ Agar Triple Sugar Iron (TSI)-MERCK 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Marcador de peso molecular ✓ ClNa al 0.9% ✓ Etanol grado reactivo ✓ TBE 0.5X ✓ Agarosa para electroforesis ✓ Fluorescente para electroforesis ✓ Buffer de carga 5X ✓ Agua estéril 	

ANEXO 2

Tabla 14. Resultados de la Identificación bioquímica de las cepas en estudio.

N°	Agar Mac Conkey			Medio TSI			Medio Citrato de Simmons		Medio LIA		Medio MIO			
	Crecimiento	Color	Precipitación biliar	Sup/Prof	Producción de gas	H2S	Crecimiento	Color del medio	Sup/Prof	H2S	Crecimiento	Movilidad	Indol	Ornitina
73	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
74	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
75	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
77	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
78	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
79	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
80	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
81	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
82	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
83	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
84	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
85	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
86	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
87	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
88	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
89	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
91	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
92	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
95	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
96	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
98	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
99	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
100	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-

105	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
107	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
108	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
109	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
110	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
111	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
112	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
113	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
114	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
115	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
116	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
118	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
119	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
120	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
121	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
122	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
123	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
124	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
125	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
126	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
127	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
128	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
129	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
130	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
131	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
132	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
133	+	Rosado-Rojizo	+	A/A	+	-	+	Azul	K/K	-	+	-	-	-
Agar Mac Conkey: colonias tamaño mediano, mucosas, con borde regular, forma circular y aspecto liso y brillante.														

*Sup/Prof: Superficie/Profundidad, H2S: Producción de sulfuro de hidrógeno, A/A: Superficie ácida, fondo ácido, K/K: Fondo alcalino, superficie alcalina, +: positivo, -: negativo.

ANEXO 3

Tabla 15. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de pacientes clínicos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen

N°	AMK		AMC		SAM		ATM		CEP		FEP		CTX		FOX		CAZ		CXM		CIP		COL		ETP		FOS		GEN		IPM		LVX		MEM		NIT		NOR		TZP		TGC		TOB		SXT	
	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In		
73	<=8	S	>16/8	R									>16	R	16	I	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	<=1	S	<=1	S	<=1	S					>64	R			>8	R	>4/76	R
74	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
75	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
77	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
78	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
79	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
80	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R			>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R					>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
81	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
82	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
83	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	2	S	>8	R					>64	R			>8	R	<=2/38	S
84	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
85	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
86	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	64	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R	64	I	>1	R	>64	R			>8	R	>4/76	R
87	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
88	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
89	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
91	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
92	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
95	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	64	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R
96	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	4	R					>64	R			>8	R	<=2/38	S
98	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R					>64	R			>8	R	>4/76	R

N°	AMK		AMC		SAM		ATM		CEP		FEP		CTX		FOX		CAZ		CXM		CIP		COL		ETP		FOS		GEN		IPM		LVX		MEM		NIT		NOR		TZP		TGC		TOB		SXT	
	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In		
99	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R		
100	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	>64	R	>8	R	8	R	>4	R	8	R	64	-	>8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R		
105	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R			>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	>64	R	>8	R	>8	R	>4	R	>8	R				>64	R	<=1	S	>8	R	<=2/38	S			
107	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	4	R	<=1	S	8	R	<=32	S	>1	R	>64	R			>8	R	>4/76	R
108	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	8	R	64	I	>1	R	>64	R			>8	R	>4/76	R
109	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	4	R	<=1	S	8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
110	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	4	R	<=1	S	4	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
111	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	4	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
112	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R			>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R				>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R	
113	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R	64	I	>1	R	>64	R			>8	R	>4/76	R
114	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R	64	I	>1	R	>64	R			>8	R	>4/76	R
115	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	<=1	S	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	<=4	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
116	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
118	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	>4	R	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	2	I	>8	R	>2/38	R
119	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
120	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	4	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
121	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
122	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	64	S	>8	R	4	R	<=1	S	8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
123	<=8	S	>16/8	R									>16	R	16	I	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
124	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
125	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	>8	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
126	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	2	I			>1	R	<=32	S	>8	R	8	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
127	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	2	I	>8	R	>2/38	R
128	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R
129	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R	64	-	>8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R

N°	AMK		AMC		SAM		ATM		CEP		FEP		CTX		FOX		CAZ		CXM		CIP		COL		ETP		FOS		GEN		IPM		LVX		MEM		NIT		NOR		TZP		TGC		TOB		SXT	
	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In	CIM	In		
130	>32	R	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	>8	R	>4	R	>8	R	>64	-	>8	-	>64	R	>2	R	>8	R	>2/38	R		
131	<=16	S	>16/8	R	>16/8	R	>8	R	>16	-	>8	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R	<=2	S	>1	R	<=64	S	>8	R	8	R	<=2	S	>8	R	64	-	8	-	>64	R	<=1	S	>8	R	>2/38	R		
132	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	4	R	<=1	S	4	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	
133	<=8	S	>16/8	R									>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>2	R			>1	R	<=32	S	>8	R	4	R	<=1	S	>8	R				>64	R			>8	R	>4/76	R	

*CIM: concentración inhibitoria mínima mcg/ml, In: interpretación, S: sensible, I: intermedio, R: resistente, -: no probado, AMK: Amikacina; AMC: Amoxicilina+Ácido Clavulánico; AMP: Ampicilina; SAM: Ampicilina+Sulbactam; ATM: Aztreonam; CEP: Cefalotina; FEP: Cefepime; CTX: Cefotaxima; FOX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CXM: Cefuroxima; CIP: Ciprofloxacina; COL: Colistina; ETP: Ertapenem; FOS: Fosfomicina; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; LVX: Levofloxacina; MEM: Meropenem; NIT: Nitrofurantoína; NOR: Norfloxacina; TZP: Piperacilina-tazobactam; TGC: Tigeciclina; TOB: Tobramicina; SXT: Trimetoprima+sulfametoxazol.

ANEXO 4

Tabla 16. Características clínico-epidemiológicas de las cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* procedentes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

N°	Muestra	Sexo	Procedencia	Servicio	FRSM
73	Hisopado Rectal	F	H	Gastroenterología	10/04/2018
74	Espuito	M	H	Cirugía de Tórax	10/04/2018
75	Secreción Bronquial	M	H	Cuidados Intensivos	11/04/2018
77	Hisopado Rectal	M	H	Neurología	16/04/2018
78	Hisopado Rectal	M	E	Sala Observación Cirugía	16/04/2018
79	Punta de Catéter	M	H	Cuidados Intensivos	16/04/2018
80	Aspirado Bronquial	M	E	Sala 6 Observación Medicina	16/04/2018
81	Secreción Intratraqueal	M	H	Cuidados Intensivos	17/04/2018
82	Hisopado Rectal	F	H	Cirugía cabeza y cuello	18/04/2018
83	Hisopado Rectal	M	H	Medicina interna 3	18/04/2018
84	Hisopado Rectal	M	H	Cuidados Intermedios	18/04/2018
85	Hisopado Rectal	F	H	Gastroenterología	18/04/2018
86	Orina	F	E	Sala de Observación Medicina 4	18/04/2018
87	Secreción Respiratoria	F	E	Sala de Observación Medicina 4	18/04/2018
88	Hisopado Rectal	F	H	Medicina Interna 2	20/04/2018
89	Hisopado Rectal	F	H	Medicina Interna 3	20/04/2018
91	Herida de Pie Diabético	F	H	Medicina Interna 3	20/04/2018
92	Secreción de Heridas	M	E	Sala de Observación	21/04/2018
95	Hisopado Rectal	F	E	Sala Observación Medicina 2	23/04/2018
96	Hisopado Rectal	M	H	Medicina Interna 3	23/04/2018
98	Hisopado Rectal	M	H	Medicina Interna 3	25/04/2018
99	Sangre	M	H	Cuidados Intensivos	25/04/2018
100	Secreción de Heridas	F	H	Cirugía Plástica y Quemados	25/04/2018
105	Tejido	F	H	Cirugía Plástica y Quemados	28/04/2018
107	Orina	F	H	Medicina Interna 1	28/04/2018
108	Orina	M	E	Sala Observación Cirugía	28/04/2018
109	Hisopado Rectal	F	H	Medicina Interna 2	30/04/2018
110	Hisopado Rectal	F	H	Medicina Interna 2	30/04/2018

N°	Muestra	Sexo	Procedencia	Servicio	FRSM
111	Hisopado Rectal	F	H	Cirugía Plástica y Quemados	3/05/2018
112	Aspirado Bronquial	M	E	Unidad de Cuidados Especiales	3/05/2018
113	Orina	M	H	Geriatría	2/05/2018
114	Orina	F	H	Medicina Interna 3	3/05/2018
115	Secreción de heridas	M	H	Cuidados Intensivos	4/05/2018
116	Secreción Bronquial	M	E	Unidad de Cuidados Especiales	5/05/2018
118	Secreción de Herida Operatoria	F	H	Cirugía General 1	10/05/2018
119	Hisopado Rectal	M	E	Sala 2 Observación Cirugía	10/05/2018
120	Secreción de Herida Operatoria	F	H	Cuidados Intensivos	10/05/2018
121	Hisopado Rectal	F	H	Gastroenterología	12/05/2018
122	Hisopado Rectal	M	E	Sala de Observación Cirugía	12/05/2018
123	Hisopado Rectal	M	E	Sala 6 Observación Medicina	12/05/2018
124	Hisopado Rectal	M	E	Unidad de Cuidados Especiales	12/05/2018
125	Hisopado Rectal	F	H	Medicina Interna 1	12/05/2018
126	Hisopado Rectal	M	H	Cirugía General 5	12/05/2018
127	Sangre	M	E	Sala 5 Observación Medicina	15/05/2018
128	Secreción de heridas	F	H	Cirugía cabeza y cuello	15/05/2018
129	Secreción de heridas	F	H	Cirugía cabeza y cuello	15/05/2018
130	Secreción de heridas	M	H	Cirugía General 4	16/05/2018
131	Pared Abdominal	F	H	Cuidados Intermedios	17/05/2018
132	Hisopado Rectal	M	H	Geriatría	18/05/2018
133	Hisopado Rectal	M	E	Sala 5 Observación Medicina	18/05/2018

* N°: Número de muestra adaptado para el estudio, M: Masculino, F: Femenino, H: Hospitalización, E: Emergencia, FRSM: Fecha de recepción en el Servicio de Microbiología del HNGAI

ANEXO 5

Tabla 17. Fenotipo y genotipo de las cepas estudiadas según procedencia

Cepa N°	Procedencia	Fenotipo	Genotipo			
			Bla SHV	Bla TEM	Bla NDM	Bla KPC
73	R	BLEE	+	+	-	-
74	S	Carbapenemasa	+	+	-	-
75	S	Carbapenemasa	-	+	+	-
77	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
78	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
79	S	Carbapenemasa	+	+	+	-
80	S	Carbapenemasa	+	+	+	-
81	S	Carbapenemasa	-	+	+	-
82	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
83	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
84	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
85	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
86	S	Carbapenemasa	-	+	-	-
87	S	Carbapenemasa	-	+	+	-
88	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
89	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
91	S	Carbapenemasa	-	+	+	-
92	S	Carbapenemasa	-	+	+	-
95	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
96	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
98	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
99	S	Carbapenemasa	-	+	+	-
100	S	Carbapenemasa	+	+	+	-
105	S	Carbapenemasa	+	+	+	-
107	S	Carbapenemasa	-	-	+	-
108	S	Carbapenemasa	-	-	+	-
109	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
110	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
111	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
112	S	Carbapenemasa	-	-	+	-
113	S	Carbapenemasa	-	-	+	-
114	S	Carbapenemasa	-	-	+	-
115	S	Carbapenemasa	-	-	-	-
116	S	Carbapenemasa	+	+	-	-
118	S	Carbapenemasa	+	+	+	-

Cepa N°	Procedencia	Fenotipo	Genotipo			
			Bla SHV	Bla TEM	Bla NDM	Bla KPC
119	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
120	S	Carbapenemasa	+	+	-	-
121	R	Carbapenemasa	-	-	+	-
122	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
123	R	Carbapenemasa	+	+	+	-
124	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
125	R	Carbapenemasa	-	-	-	-
126	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
127	S	Carbapenemasa	+	-	-	-
128	S	Carbapenemasa	-	-	+	-
129	S	Carbapenemasa	+	+	+	-
130	S	Carbapenemasa	+	+	+	+
131	S	Carbapenemasa	+	+	+	-
132	R	Carbapenemasa	-	+	+	-
133	R	Carbapenemasa	-	+	+	-

* N°: Número de muestra adaptado para el estudio, R: Procedencia de muestra de hisopado rectal, S: Procedencia de muestra sistémica, +: positivo, -: negativo

ANEXO 6

Tabla 18. Matriz de Operacionalización de variables

Variables Independientes		Definición Conceptual	Definición Operacional	Métodos		Indicador	Categorías	Criterios de medición	Tipo	Escala de medición
betalactamasas de espectro extendido	Gen Bla ^{TEM} Gen Bla ^{SHV}	Genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam.	Identificación de la producción de enzimas mediante los genes que las codifican a través de pruebas fenotípicas y técnica de PCR.	Fenotípicos	Método basado en inhibidores de β-lactamasas	Valor del diámetro del halo de inhibición	P	> 5mm	C	N
							A	< 5mm		
					Método de disco combinado		P	>= 5mm entre discos	C	N
							A	< 5mm		
				Genotípico	Técnica de PCR y electroforesis	Peso del amplicón	TEM	1078 pb	C	N
							SHV	870 pb	C	N
carbapenemasas	Gen Bla ^{NDM} Gen Bla ^{KPC}	Genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar carbapenemes.	Identificación de la producción de enzimas mediante los genes que las codifican a través de pruebas fenotípicas y técnica de PCR.	Fenotípicos	a) Método modificado de inactivación de carbapenemasas	Valor del diámetro del halo de inhibición	P	6-15 mm	C	N
							A	≥ 19 mm		
							I	16-18 mm		
					b) Método de sinergia a doble disco con APB	Presencia de halo de inhibición	P	aumento del halo de inhibición	C	N
							A	-		
					c) Método de sinergia a doble disco con EDTA-SMA		P	aumento del halo de inhibición	C	N
							A	-		
				Genotípico	Técnica de PCR y electroforesis	Peso del amplicón	NDM	712pb	C	N
							KPC	340pb	C	N

* P: Presencia, A: Ausencia, I: Indeterminado, C: Cualitativa, N: Nominal

ANEXO 7

Tabla 19. Matriz de Consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
<p>PROBLEMA GENERAL -¿Cuáles son los genes de resistencia: betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas que se encuentran presentes en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de pacientes hospitalizados en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen de abril –mayo del 2018?</p> <p>PROBLEMAS ESPECIFICOS - ¿Cuáles son los genes codificantes para: betalactamasas de espectro extendido que se determinarán a través de los métodos fenotípicos y genotípicos en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>? -¿Cuáles son los genes codificantes para carbapenemasas que se determinarán a través de los métodos fenotípicos y genotípicos en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL: -Detectar la presencia de genes: betalactamasas de espectro extendido (TEM Y SHV) y carbapenemasas (NDM Y KPC), en aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en un hospital de Lima Metropolitana de nivel IV.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS: -Realizar la detección fenotípica y genotípica de betalactamasas de espectro extendido en cepas de <i>K. pneumoniae</i>. Realizar la determinación fenotípica y genotípica de carbapenemasas en cepas de <i>K. pneumoniae</i>.</p>	<p>-Las cepas clínicas en estudio de <i>Klebsiella pneumoniae</i> del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen presentan los genes de resistencia betalactamasas de espectro extendido (TEM y SHV) y carbapenemasas (KPC y NDM).</p>	<p>Variable dependiente: -Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p> <p>Variable independiente: - Genes betalactamasas de espectro extendido: Gen TEM Gen SHV - Genes carbapenemasas: Gen KPC Gen NDM</p>	<p>Tipo y diseño general de estudio: observacional, descriptivo. Muestra: 50 cepas hospitalarias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aisladas de muestras de hisopado rectal y sistémicas (Orina, sangre, tejido, secreción bronquial, y secreción de heridas) de pacientes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen recolectadas por el Laboratorio de Microbiología del hospital.</p> <p>Métodos fenotípicos : Confirmación fenotípica de betalactamasas de espectro extendido: a) Método basado en la utilización de inhibidores de betalactamasas b) Método de disco combinado Confirmación fenotípica de carbapenemasas a) Método modificado de inactivación de carbapenemasas (MICm) b) Sinergia a doble disco con ácido fenilborónico (APB) c) Sinergia a doble disco con ácido etilendiaminotetraacético asociado a mercaptoacetato de sodio (EDTA-SMA) Método genotípico: : -Técnica de PCR</p>

ANEXO 8

Documento de aprobación del Proyecto de Investigación en el HNGAI



“Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Inmunidad”

CARTA N° ~~720~~ GRPA-ESSALUD-2019

Lima, 21 FEB 2019.

Investigadores Principales:
MARIA VICTORIA CAPARACHIN GONZÁLES
JHOSELIN MARIA MALLQUI ZAMALLOA
Servicio de Farmacia
Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen– EsSalud
Presente. -

Asunto: AUTORIZACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN OBSERVACIONAL

Ref. : CARTA N° 594 OlyD-GRPA-ESSALUD-2019

De mi consideración:

Mediante la presente me dirijo a usted en atención al documento de la referencia en el cual usted solicita la autorización del Proyecto de Investigación N° 183-2018 Estudio Observacional: “Identificación de genes y resistencia: Betalactamasas de espectro extendido (TEM y SHV) y Carbapenemasas (KPC y NDM), en cepas de *Klebsiella Pneumoniae* en un Hospital de nivel IV de Lima Metropolitana, Perú”, cuyos investigadores principales: Maria Victoria Caparachin Gonzáles y Jhosselin Maria Mallqui Zamalloa Internas de Farmacia.



Al respecto, habiendo sido el proyecto de investigación en mención evaluado y aprobado por el Comité de Investigación y revisado como exceptuado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen EsSalud, los cuales velan por el cumplimiento de las directrices metodológicas y éticas correspondientes, incluyendo las Buenas Prácticas Clínicas, los principios de protección de los sujetos de investigación contenidos en la Declaración de Helsinki, y la Directiva N° 04-IETSI-ESSALUD-2016 de investigación en EsSalud y habiendo cumplido con presentar la documentación correspondiente, incluyendo los documentos de aprobación de los comités respectivos y el proyecto de investigación observacional, esta Gerencia AUTORIZA la realización del proyecto de investigación señalado.

Sin otro particular, quedo de usted.

Muy atentamente,

RED PRESTACIONAL ALMENARA

Dr. JORGE E. AMOROS CASTAÑEDA
GERENTE
ESSALUD

JAC/JDQL/ecf
NIT: 753-2018-2276